

Antikörper-Selektive Materialien für
die Produkt Aufreinigung:
Gepfropfte PET- und Cellulose-basierte
Makroporöse Membranadsorber

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Sebastian Schwark

geboren in Dinslaken

Lehrstuhl für Technische Chemie II
der

Universität Duisburg-Essen

Essen 2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2009 bis Dezember 2012 unter Anleitung von Prof. Dr. Mathias Ulbricht am Institut für Technische Chemie II an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

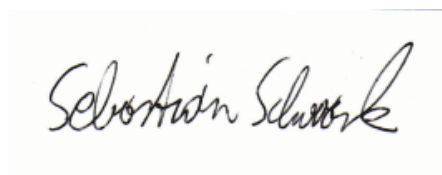
Tag der Disputation: 23.05.2013

Gutachter: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

Prof. Dr. Thomas Schrader

Vorsitzender: Prof. Dr. Eckhard Spohr

Hiermit bestätige ich, diese Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

A handwritten signature in black ink, reading "Sebastian Schwark", is positioned above a horizontal line. The signature is written in a cursive style with a large, stylized 'S' and 'K'.

Sebastian Schwark

Danksagungen

Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. Mathias Ulbricht für Ermöglichung dieser Doktorarbeit, für die Bereitstellung des Themas und für den Rat und die Unterstützung während der Promotion. Auch dank ich ihm für die vielen hilfreichen Diskussionen und die Freiheiten die er mir während der Promotion gewährt hat.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Thomas Schrader für die Übernahme des Koreferats.

Herr Prof. Dr. Thomas Schrader und Herr Dr. Börje Sellergren bin ich dankbar für den regen Austausch mit ihren Arbeitsgruppen, für die Unterstützung mit Material und know how.

Weiterer Dank gilt allen derzeitigen und Ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises wegen der freundlichen Unterstützung. Besonderer Dank gilt dabei meinen Bachelor Studentinnen Pina Yildiz und Lisa Gamrad, meiner Hilfswissenschaftlerin Anica Fürst. Bei den Technischen Mitarbeitern Inge Danielzik, Tobias Kallweit und Claudia Schenk möchte ich mich bedanken, da sie bei Problemen stets hilfsbereit waren. Weiterhin danke ich auch noch allen Doktoranten der Arbeitsgruppe für die anregenden Diskussionen und Ideen.

Vor allen möchte ich mich aber bei meiner Familie und meinen Freunden für den andauernden Rückhalt und Unterstützung während der Zeit bedanken. Auch dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für Probleme hatten und für Ablenkung und Aufmunterung gesorgt haben.

Abschließend möchte ich mich noch beim „AbCap“ Konsortium und beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, #0315339E) für die finanzielle Förderung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	9
Abkürzungsverzeichnis	11
Symbolverzeichnis	13
1. Einleitung.....	14
2. Grundlagen.....	15
2.1 Antikörper	15
2.1.1 Industrielle Herstellung von monoklonalen Antikörpern	17
2.1.2 Reinigung von monoclonalen Antikörpern.....	18
2.2 Membranadsorber.....	21
2.2.1 Adsorption an Oberflächen	22
2.2.2 Klassifizierung von Membranadsorbern	23
2.3 Oberflächenfunktionalisierung von Membranen.....	25
2.3.1 „Grafting from“-Methode	27
2.3.2 „Synergist Immobilisierung“	28
2.3.3 „RAFT“.....	29
2.4 Molekular Geprägte Polymere	31
3. Zielsetzung und Konzept	34
4. Experimentalteil.....	38
4.1 Synthesen	38
4.1.1 Synthese von 5-(Methacrylamino)-m-xylobis-lithiumphosphate.....	38
dimethylester	38
4.1.2 Synthese von 6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid- β -cyclodextrin.....	40
4.1.3 Synthese von <i>N</i> -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- <i>N</i> -bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat	41
4.1.4 Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure	42
4.1.5 Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid	42
4.2 Photoinitiator Immobilisierung.....	43
4.2.1 Kovalent immobilisierter „Typ I“-Photoinitiator.....	43

4.2.2 "Synergist Immobilisierung"	44
4.3 „Grafting from“	45
4.3.1 Pfropfen in einer 96er Titerplatte	46
4.3.2 Herstellung von „Kamm ähnlichen“-Strukturen	46
4.3.3 Herstellung von molekular geprägten Polymeren	48
4.4 Membran Charakterisierung	49
4.4.1 Pfropfungsgrad.....	49
4.4.2 Permeabilität	50
4.4.3 Kontaktwinkel Messungen	51
4.4.4 Permporometrie Messungen	52
4.4.5 BET Messungen.....	53
4.5 Charakterisierung des immobilisierten Photoinitiators	54
4.6 Charakterisierung der Pfropf-Copolymere	55
4.7 Protein Adsorptionsmessungen	57
4.7.1 Statische Adsorptionsmethode	57
4.7.1.1 Erstellung von Adsorptionsisothermen	58
4.7.2 Dynamische Adsorptionsmethode	60
4.8 Messungen der Protein Selektivität	61
4.8.1 Einzelmessmethode.....	61
4.8.2 Mischungsmethode	61
4.8.3 Dynamische Messungen.....	64
5. Ergebnisse.....	65
5.1 Synthesen	65
5.1.1 Monomere	65
5.1.2 Photoinitiatoren	71
5.2 Pfropfung von PET-Membranen	76
5.2.1 Pfropfungsgrad.....	76
5.2.2 Kontaktwinkel der Membranen	78
5.2.3 Permporometrie Daten und Permeabilität der Membranen	79
5.2.4 Variation des Pfropfungsgrads mittels „Abstandhalter“-Monomer	82

5.3 Pfropfung von Cellulose-Membranen	85
5.3.1 Ppropfungsgrad.....	87
5.3.2 Variation der Photoinitiatordichte	91
5.3.3 Ppropfdichten	94
5.3.4 Ppropf-Copolymer Zusammensetzung	97
5.3.5 Vergleich „Typ I“ Photoinitiator mit „Synergist Immobilisierung“	100
5.4 Proteinbindungskapazitäten.....	101
5.4.1 Statische Adsorption auf PET-Membranen	102
5.4.2 Statische Adsorption auf Cellulose-Membranen	104
5.4.3 Adsorptionsisothermen	108
5.4.4 Dynamische Adsorption	111
5.5 Protein Selektivitäten	112
5.5.1 Mischungsmethode durch Elektrophorese analysiert	113
5.5.2 Einzelmessungen.....	115
5.5.3 Mischungsmethode durch GPC analysiert	120
5.5.4 Dynamische Selektivitäten.....	123
5.6 Verbesserung der Kapazität	126
5.6.1 Variation der Ppropfbedingungen	126
5.6.2 „Kamm ähnliche“-Strukturen.....	129
5.6.2 Titerplatten-Prozedur	134
5.7 Molekular geprägte Polymere	136
5.7.1 Ppropf-Polymerisation.....	136
5.7.2 Protein Adsorption.....	138
5.7.3 Protein Selektivitäten	140
6. Diskussion der Ergebnisse	142
6.1 Synthese.....	142
6.2 Ppropfung der Membranen.....	144
6.2.1 Einfluss der Initiierung.....	144
6.2.2 Polymerisation.....	149
6.2.3 Änderung der Oberflächeneigenschaften.....	158

6.2.4 Erhöhung des DG-Werts, Titerplatten-Prozedur	160
6.3 Protein Adsorption.....	163
6.3.1 Einfluss auf die Adsorption	164
6.3.2 Vergleich statische-, dynamische Adsorption.....	180
6.3.3 Erhöhung der Kapazität, Titerplatten-Prozedur.....	181
6.4 Molekular geprägten Polymere	183
6.4.1 Präparation	183
6.4.2 Kapazität und Selektivität in Vergleich zum DG	184
6.4.3 Vergleich MIP mit den maßgeschneiderten Polymeren	186
7. Fazit und Ausblick	187
8. Literaturverzeichnis	191
9. Anhang	197
9.1 Chemikalienliste	197
9.2 Liste der Publikationen.....	200
9.3 Lebenslauf	201

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Modifizierung von PET- und Cellulose-Membranen mit maßgeschneiderten Polymeren. Diese Modifizierung dient dazu, Gruppen einzuführen um eine selektive Bindung zu Immunglobulin G (IgG) zu erhalten. Zu diesem Zweck ist eine neue Methode zur UV-Pfropfung entwickelt worden. Bei dieser Methode wird ein „Typ I“ Photoinitiator kovalent auf der Membranoberfläche immobilisiert. Als Ausgangsmaterial für den Photoinitiator dient Benzoinethylether, welcher in die Photoinitiatoren 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäure und 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäurebromid umgewandelt werden konnte. Diese Initiatoren konnten dann kovalent an die PET- und Celluloseoberflächen gekoppelt werden.

Ein Vergleichstest mit der etablierten „Synergist Immobilisierung“ zeigt, dass mit der neuen UV-Pfropfungsmethode ähnliche Pfropfdichten erreicht worden sind. Dazu wird aber deutlich weniger Photoinitiator benötigt, und die neuen Methoden zeigen auch noch eine bessere Reaktionskontrolle auf Oberflächen wie Cellulose. Auch konnte der Anteil an Nebenprodukten im Vergleich zur „Synergist Immobilisierung“ deutlich reduziert werden. Weiterhin konnte mit der neuen Methode die Dichte an Photoinitiator, durch die Zugabe von Benzoessäure bzw. Benzoessäurebromid, variiert werden, wobei die höchsten Photoinitiatordichten und damit zusammenhängend die höchsten Pfropfdichten, nicht bei 100% Photoinitiator Anteil erreicht worden sind. Zusätzlich ist es mit der neuen Methode möglich, die Struktur der Polymere zwischen Pilz-, Bürstenstruktur und „Kamm ähnlich“-Struktur zu wechseln. Für die „Kamm ähnlichen“-Strukturen sind die Membranen mit einen „Rückgrat“-Polymer versehen worden. Auf diesem „Rückgrat“-Polymer konnte dann noch einmal Photoinitiator immobilisiert und eine Pfropfung mit Monomeren durchgeführt werden. Mit der etablierten neuen Methode sind dann UV-Pfropfungen mit den maßgeschneiderten Monomeren durchgeführt worden. Dabei zeigt sich, dass die DG-Werte stark vom dem jeweiligen Monomeren bzw. Monomermischungen abhängen. So konnten Unterschiede im DG-Wert um den Faktor zwanzig gefunden werden, obwohl alle Monomere dieselbe Reaktivgruppe aufweisen. Weiterhin zeigen sich für die Copolymere größere DG-Werte als die Homopolymere. Aus diesem Grund sind alle weiteren Pfropf-Polymerisationen als Co-Polymerisationen mit dem „Abstandhalter“-Monomer 2-Hydr durchgeführt worden. Das verringert den Abstand zwischen reaktivsten und den unreaktiven Monomeren. Beim Vergleich der Pfropf-Polymerisationen zeigen sich auch Unterschiede zwischen PET- und Cellulose-Membranen. Diese Unterschiede basierten auf der Affinität der Monomere zu den Membranen. Wenn die Affinität der Monomere zum Membranmaterial groß ist, konnte die Polymerisation verbessert werden. Weiter zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Möglichkeit den DG-Wert durch längere Reaktionszeiten oder einer höheren Monomerkonzentration zu beeinflussen, vom eingesetzten Monomer abhängt. Für einige Monomere zeigt der

Pfropfungsgrad (DG) einen Grenzwert, während anderen Monomere solange eine Reaktion zeigen, bis das Monomer aufgebraucht ist. Verantwortlich dafür sind die Wechselwirkungen der Monomere untereinander.

Mit den gepfropften Membranen sind Adsorptionstests durchgeführt wrden. Bei diesen Tests konnte die Kapazität der Membranen für IgG ermittelt werden. Dabei zeigt sich, dass die Beschichtung der Membranen einen starken Einfluss auf die IgG Kapazität hat, das Membranmaterial aber nicht. Die Tests ergeben nur für einige Beschichtungen eine Erhöhung der IgG-Kapazität, andere zeigen eine Verringerung der Kapazität und bei einigen Beschichtungen ist so gut wie kein Einfluss auf die Kapazität zu sehen. Die Membranen mit denen eine gute IgG-Kapazität erreicht werden konnte, sind dann mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader zu den besten Adsorbern weiterentwickelt worden. Diese besten Adsorber erreichten zwar keine hohen DG-Werte, aber dafür hohe IgG-Kapazitäten und hohe Affinitäten zum IgG. Im Vergleich zu konventionellen Ionenaustauschern zeigen die besten Adsorber deutlich höhere Affinitäten. Dabei konnten diese Affinitäten auf synergistische Effekte zurückgeführt werden.

Nach den Adsorptionstests erfolgte die Bestimmung der IgG-Selektivität. Dazu sind erst Screening Tests mittels Elektrophorese durchgeführt worden. Diese zeigen, dass neben den besten Adsorbern nur wenige Beschichtungen eine IgG Selektivität aufweisen. Darunter sind die Ausgangsmischungen für die besten Adsorber und zwei konventionelle Ionenaustauscher. Unter strömenden Bedingungen sind dann nur noch Selektivitäten für die besten Adsorber festgestellt worden.

Weiterhin zeigte sich, dass diese Membranadsorber unabhängig von ihrer Größe funktionierten. Die Membranen können dabei mit 5 mm Größe in einer Titerplatte funktionalisiert werden und es zeigt sich keinen Unterschied beim DG-Wert oder bei der IgG-Kapazität der Membranen.

Weiterhin zeigt ein Vergleich, mit ebenfalls hergestellten MIPs, dass die DG-Werte der MIPs zwar größer sind als die der Membranen mit Aminosäure selektiven Monomeren, aber sowohl die Kapazität als auch die Selektivität der beiden Membranarten sind vergleichbar. In dieser Arbeit konnten daher Antikörper-Selektive Membranen auf zweierlei Arten hergestellt werden.

Abkürzungsverzeichnis

2-Hydr	N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid
Ad.	Adsorption
Ammo	2-Methacrylamidoethan-1-ammoniumchlorid
AMPS	2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
β -Cyc	6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)- methacrylamid)- β -cyclodextrin
Bis	5-(Methacrylamino)-m-xylolbislithiumphosphatedimethylester
B(OH) ₂	2-(((Ethylamino)ethyl)methacrylamid)phenylborsäure
Bzamidin	N-(4-Amidinophenyl)methacrylamid
C	Kohlenstoff
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
C-Hex	N-(Cyclohexylmethyl)methacrylamid
CVD	Chemische Dampf Abscheidung
D ₂ O	Deuteriumoxid (schweres Wasser)
De.	Desorption
DEEDA	N,N-Diethylethylendiamin
DG	Pfropfungsgrad
DMAPEAA	3-(Dimethylamino)propylacrylat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dode	N-Dodecylmethacrylamid
EDA	Ethylendiamin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPI	Epichlorhydrin
EtOAc	Ethylacetat
Et ₃ N	Triethylamin
GAMA	D-(Gluconamidoethyl)-methacrylamid
GPC	Gel Permeations Chromatographie
H-Atome	Wasserstoffatome
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSA	Human Serum Albumin
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
KOH	Kaliumhydroxid
LiBr	Lithiumbromid
LiOH	Lithiumhydroxid
logKow	<i>n</i> -Oktan-1-ol-Wasser-Verteilungskoeffizient
Lys	Lysozym
mAb	monoclonaler Antikörper
MilliQ-H ₂ O	hochreines Wasser (Umkehrosmose gereinigt, Leitfähigkeit <5µS)
MIP	Molekular geprägtes Polymere
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NIP	Nicht geprägte Polymere
O	Sauerstoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pd	Palladium
PET	Polyethylenterephthalat
Ph.	Photoinitiator
PI	Photoinitiator
PMMA	Polymethacrylat
RAFT	Reversible Additions Fragmentierungs Ketten Transfer Polymerisation
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
SS6	4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure
SSBr	4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid
SSBr ₂	2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure-bromid
T10	Epitop-Peptid, die Sequenz ist in Abbildung 4.3.5 Aufgetragen
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
UV	Ultra Violette Strahlung
VP	Vinylphosphonsäure
VS	Vinylsulfonsäure
Wt	Massenanteil

Symbolverzeichnis

A	Fläche (der Membran)
$\alpha_{KA/KB}$	Selektivität von K_A/K_B
B	Achsenabschnitt
C_{eq}	Gleichgewichtskonzentration der Lösung
d	Durchmesser (Porendurchmesser)
d_m	mittlerer (Poren)-Durchmesser
Δd_m	Abweichung von der mittleren Porengröße
ΔP	Transmembrandruck
Δt	Durchflusszeit
ε	Porosität
F_D	Gasflussrate durch die trockene Membran
f_F	Anzahl einer Porengröße in Prozent
F_w	Gasflussrate durch die benetzte Membran
$\gamma \cos \theta$	Differenz der Oberflächenspannungen Flüssigkeit/Gas
γ_{lg}	Grenzflächenenergie flüssig/gasförmig
γ_{sg}	Grenzflächenenergie fest/gasförmig
γ_{sl}	Grenzflächenenergie fest/flüssig
η	dynamische Viskosität
J	Fluss durch eine Membran
K_A	Gleichgewichtskonzentration von IgG
K_B	Gleichgewichtskonzentration von HSA bzw. Lysozym
K_L	Sorptionskoeffizient
L	Dicke der Membran
m	Steigung
m_0	Membran Gewicht vor der Reaktion
m_1	Membran Gewicht nach der Reaktion
p	Druck
p_0	Ausgleichsdruck (Permporometrie), Sättigungsgasdruck bei der Versuchstemperatur (BET)
p_{mf}	mean flow pressure
θ	Kontaktwinkel
q	Ladung des Sorbent
q_{max}	max. Ladung des Sorbent
r_p	Porenradius
τ	Faktor für die Abweichung der Porenstruktur vom Zylinder
V	Volumen
V_m	Volumen für eine Monoschicht

1. Einleitung

Für eine ansteigende Anzahl von Prozessen in der Industrie, im Umweltschutz, Biotechnologie und Medizin ist derzeit eine breite Palette an Membranen verfügbar. Die Anwendungsgebiete für Membrantechnologie sind in den letzten Jahren stark angestiegen. Um den Herausforderungen bei diesen, meist spezialisierten Anwendungen, mit innovativen Technologien zu begegnen ist die Oberflächenspezifische Funktionalisierung von etablierten Materialien ein wichtiger Bereich in der Membrantechnologie geworden ^[1,2,3] Dazu gibt es viele Ansätze die zu funktionalisierten Oberflächen führen. Diese können in drei wichtige Kategorien unterteilt werden, „grafting to“, „grafting from“ und „Reaktiv Beschichten“ ^[1]

Besonders in molekularbiologischen oder biotechnologischen Anwendungen ist die selektive Trennung von Proteinen aus komplexen Gemischen eine große Herausforderung. Derzeit werden für diese Anwendungen meist chromatographie Säulen mit immobilisierten Biomakromolekülen verwendet, die sogenannte Affinitätschromatographie. ^[4] Diese Biomakromoleküle müssen speziell auf das Zielprotein abgestimmt werden, sind daher meist sehr teuer und haben gewöhnlich nur eine begrenzte Stabilität. Daher wird intensiv nach Alternativen für diese Biomakromoleküle gesucht. Im Interesse der Forschung stehen deshalb Rezeptoren, die auf synthetischen Polymeren basieren.

Für solche Rezeptoren gibt es zwei unterschiedliche Ansätze. Zum einen Molekular geprägte Polymere (MIPs). Hierbei dient das Ausgangsprotein als „Schablone“ für das Rezeptormaterial. ^[5] Der andere Ansatz ist das Polymer so zu designen, dass es selbst als Rezeptor dient. Dabei können die einzelnen Monomerbausteine auf spezifische Aminosäuren im Protein abgestimmt werden und somit selektiv an diese binden. ^[6,7]

Für biotechnologische Anwendungen ist es besonders interessant, solche selektiven Polymere auf festen Trägern, wie makroporöse Membranadsorber zu immobilisieren, da Membranadsorber einen höheren Durchsatz als klassische Chromatographiesäulen haben und bei geringeren Drücken gearbeitet werden kann. ^[1] Daher sind Membranadsorber energietechnisch günstiger als Chromatographiesäulen und können die Kosten einer Produktaufreinigung verringern. ^[8,9]

Das Problem bei der Herstellung von Membranadsorbern ist aber, dass die Affinitäten und Selektivitäten nach einer ungerichteten Immobilisierung, im Vergleich zur homogenen Lösung, stark verringert sein können. Um Problemen wie diesen entgegenzuwirken, liegt eine besondere Herausforderung darin, die Oberflächenmodifizierung auf den entsprechenden Einsatz durch Weiterentwicklung bekannter Methoden anzupassen.

2. Grundlagen

2.1 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobulinen genannt, sind Glykoproteine, die als Erkennungselement der Immunantwort von Wirbeltieren fungieren. Die erste Beschreibung von Antikörpern erfolgte durch die schwedische Immunologin Astrid Fagraeus.^[10] Die Hauptaufgabe der Antikörper besteht in der spezifischen Bindung an Pathogenen. Durch diese Bindung werden dann die Pathogene für das restliche Immunsystem markiert.^[11] Die Produktion im Körper erfolgt durch B-Lymphozythen, und zwar als Antwort auf fremde Substanzen im Organismus. Diese B-Lymphozyten können fünf unterschiedliche Antikörpertypen erzeugen. Diese Antikörper Typen werden als IgA, IgD, IgE, IgG und IgM bezeichnet. Von diesen fünf Typen tritt IgG am häufigsten auf.^[11,12]

Der Aufbau aller Antikörper-Typen ist generell gleich. Antikörper sind aus vier Polypeptidketten aufgebaut, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die vier Polypeptidketten können in jeweils zwei gleich aufgebaute leichte- und schwere-Ketten unterteilt werden.^[13] Die leichte Kette ist hierbei aus 214 Aminosäuren aufgebaut und hat eine Molmasse von 22 kg/mol. Die schwere Kette ist aus 440 Aminosäuren aufgebaut und hat eine Molmasse von 50 kg/mol. Alle Ketten zusammen gegeben dann eine Molmasse von 144 kg/mol und einen hydrodynamischen Radius von ca. 4 nm.^[11,13] In Abbildung 2.1 ist der schematische Aufbau eines IgG dargestellt.

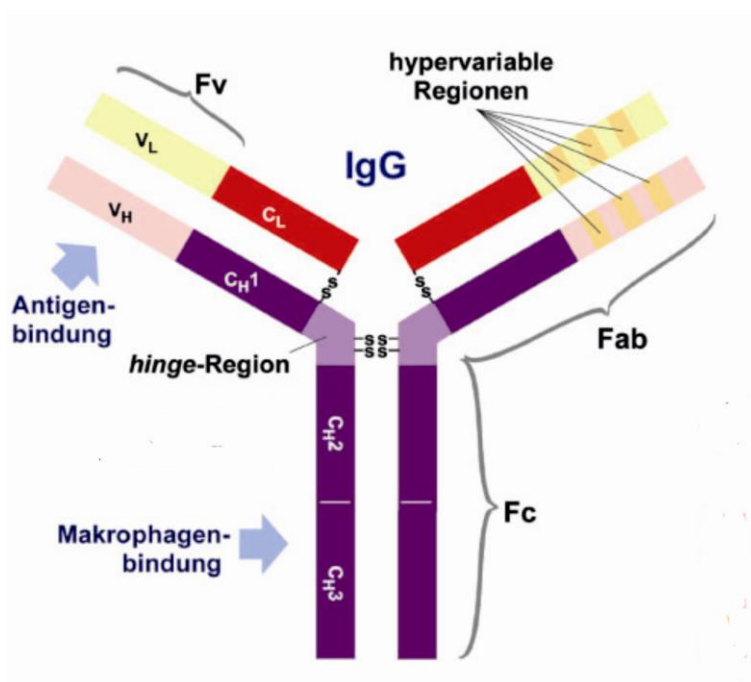


Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau eines IgG.^[11]

In der Abbildung ist zu sehen, dass die Polypeptidketten aus einer variablen Region (Fv) und eine konstanten Region (Fc) bestehen. Die variable Region der leichten Kette ist im Bereich

der N-terminalen Aminosäure zwischen Position 1 und 107. Die variable Region der schweren Kette ist auch im Bereich der N-terminalen Aminosäuren und etwa genau so groß wie der Bereich der leichten Kette.^[11,12,13]

Diese variablen Regionen sind für die Unterscheidung der verschiedenen Antikörper verantwortlich. Durch diese variablen Bereiche ist der Isoelektrischepunkt für die Antikörper nicht genau zu bestimmen. Abhängig vom Typ und der damit zusammenhängenden Primärstruktur, liegt er im Bereich von pH 5-9.^[13] Allerdings ist die variable Region der Antikörper unverzichtbar im Bezug auf ihre Funktion, da in diesem Bereich (auch FAb Bereich genannt) die Bindung der Antikörper zu den pathogenen Substanzen stattfindet. Durch die Variation des FAb Bereichs wird eine hohe Affinität zu unterschiedlichsten Bindungsepitopen erreicht und der Antikörper kann auf die jeweilige pathogene Substanz angepasst werden.^[12,14] Durch die Variation der der FAb Bereiche werden so viele Wechselwirkungen wie möglich in einen Antikörper eingebaut und das führt zu hohen Affinitäten bis in den nanomolaren Bereich.^[11]

Von größerer Bedeutung als der FAb Bereich ist in dieser Arbeit der untere Bereich der konstanten Region (Fc-Bereich). Der Fc-Bereich ist für die verschiedenen Antikörper Typen fast identisch aufgebaut.^[15] Des Weiteren spielt er bei der Aufreinigung der Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.2) mittels Protein A eine große Rolle.^[16] Der Fc Bereich besitzt einen Rezeptor mit dem der Antikörper an eine Zellmembran gebunden werden kann. Auf der Oberfläche dieser Zellmembran ist dafür das sogenannte FcR-Protein anzutreffen. (Abb. 2.2) Dieses Protein geht eine Wechselwirkung mit dem inneren Bereich des Fc Bereichs ein. (Abbildung 2.1)^[11, 17] Daher ist dieser der Zielbereich für die Aufreinigung von Antikörpern

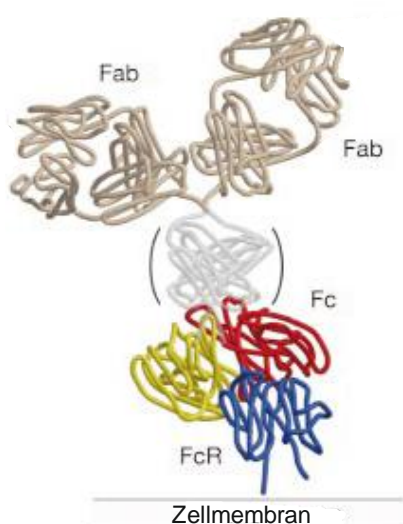


Abbildung 2.2 Darstellung der Bindung eines Antikörpers an eine Zellmembran über den Fc Bereich.^[17]

2.1.1 Industrielle Herstellung von monoklonalen Antikörpern

In der Medizin werden Antikörper in vielen Bereichen eingesetzt. Die Einsatzgebiete für die Anwendung von Antikörpern sind somit sehr vielfältig. Antikörper kommen derzeit in der Krebstherapie, bei Asthma, in der Rheumatologie, in der Virologie und bei Erkrankungen der Blutgefäße zum Einsatz.^[11,17,18]

Auf Grund dieser vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist die Herstellung von Antikörpern ein lohnenswertes Geschäft mit einer hohen Wachstumsrate. Im Jahr 2004 betrug der Markt für Antikörper Produkte 10 Milliarden US\$. Dieser Markt ist bis zum Jahr 2010 um den Faktor drei auf 30 Milliarden US\$ gestiegen.^[19]

Für die industrielle Herstellung von Antikörpern gibt es folgende Möglichkeiten:

Die Herstellung in der Bauchhöhle von Mäusen, mit Hilfe von Pflanzen und mit Hilfe von Säugerzellen.^[20,21,22,23,24,25]

Bei der Herstellung in der Bauchhöhle von Mäusen werden die Antikörper aus Hybridomzellen, welche in die Bauchhöhle von Mäusen injiziert werden, gewonnen. Das erhaltene Produkt sind Maus-Antikörper. Humane Antikörper können mit dieser Methode nur in geringen Mengen hergestellt werden.^[20,21] Im Inneren der Maus herrschen ideale Bedingungen für die Zucht von Hybridomzellen. Damit sich diese Zellen in großen Mengen in der Bauchhöhle der Maus sammeln, wird den Mäusen 5-7 Tage vor der Zellzugabe eine kleine Menge 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan in die Bauchhöhle injiziert. Dadurch wird eine lokale milde Entzündung hervorgerufen und damit erfolgt eine Akkumulierung der Zellen in der Bauchhöhle.^[20] Zur Produktisolierung wird die Flüssigkeit, die sich in die Bauchhöhle sammelt, mit einer dünnen Kanüle entfernt. Dabei verbleiben Zellen in der Bauchhöhle und es bildet sich neues Produkt. Pro Maus kann dieser Vorgang 3-4mal wiederholt werden, bevor die Maus stirbt. Dabei werden Konzentrationen an Antikörpern von 5-10 mg/ml erzeugt. Eine Maus ergibt bei dieser Methode ca. 50 mg Antikörper. Durch Reinigungsverluste können aus 1300 Mäusen ca. 50 g Antikörper gewonnen werden.^[20]

Eine andere Art Antikörper herzustellen ist die Verwendung von genetisch veränderten Pflanzen.^[24,25] Diese Art der Produktion hat den Vorteil, dass die Pflanzen auf „normalen“ Feldern wachsen können und keine Labore mit strengen hygienischen Vorschriften betrieben werden müssen.^[25] Für die Produktion von Antikörpern in Pflanzen werden häufig genetisch veränderte Tabak Pflanzen verwendet. Mit diesen Pflanzen kann eine jährliche Biomasse von ca. 25 t / ha erreicht werden.^[24] Dabei werden ca. 160 mg Antikörper pro kg Biomasse erreicht.^[26] Allerdings gibt es auch den Nachteil der Aufreinigung bei dieser Methode. Diese ist recht aufwendig und verlustreich. Während der Aufreinigung gehen mindestens 30% des Produktes verloren.^[26]

Die derzeit wichtigste Methode für die Produktion von Antikörpern ist die Kultivierung von Säugerzellen. Mit dieser Methode werden derzeit 60-70% der Antikörper hergestellt.^[23] Für

die Produktion von Antikörpern in Säugerzellen müssen diese in Bioreaktoren kultiviert werden.^[20] Diese Kultivierung der Zellen erfolgt in unterschiedlich großen Bioreaktoren mit einer gewissen Verweilzeit pro Reaktor (Abb. 2.3).^[20,27] Dabei wird die Produktion mit kleinen Mengen an Zellen (1 ml) begonnen. Durch die weitere Zucht vermehren sich dann die Zellen sehr stark, und am Ende der Produktion werden dann 100 L Bioreaktoren eingesetzt. Die gesamte Dauer für die Produktion von Antikörpern beträgt ca. einen Monat bis zur Ernte und es werden Produktkonzentrationen von 50-200 mg/ml erhalten.^[23,27]

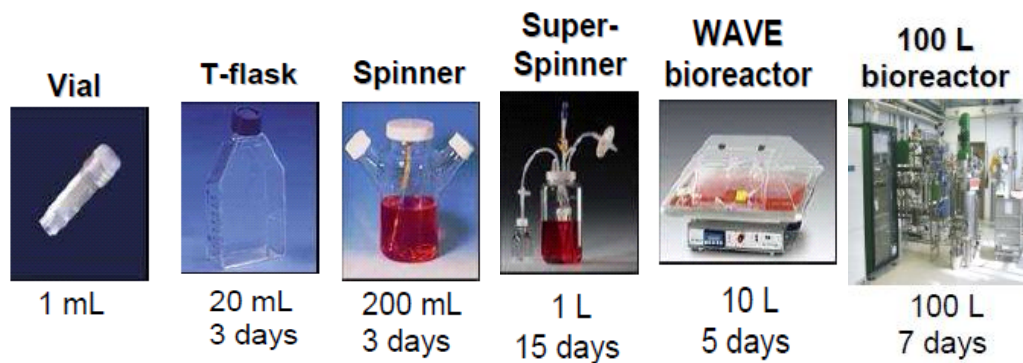


Abbildung 2.3 Herstellungsverlauf von Antikörpern mittels mammalian Zellen.^[27]

Die Produktion mit dieser Methode hat allerdings einen recht hohen technischen Aufwand zur Folge. Die Kultivierung der Zellen muss in einer sterilen Umgebung stattfinden. Außerdem müssen Parameter wie Temperatur, pH-Wert, O₂-Konzentration und CO₂-Konzentration kontrolliert und geregelt werden.^[20,28] Daher wird für die Produktion von Antikörpern mit Säugerzellen ein Labor mit hohem technischem Standard benötigt. Auch die Aufreinigung ist nicht trivial wie in Abschnitt 2.1.2 zu sehen ist. Hierbei kommt es meistens auch zu recht hohen Verlusten.^[20,28]

2.1.2 Reinigung von monoclonalen Antikörpern

Die Aufreinigung von Antikörpern ist ein mehrstufiger, aufwendiger Prozess. Dieser Prozess beinhaltet derzeit sechs unterschiedliche Stufen, um bestimmte Verunreinigungen zu entfernen (Abb. 2.4).^[29] Für die Produktion von Antikörper aus Pflanzen wird noch ein separater Schritt für die Zerkleinerung der Pflanzen selbst benötigt.^[26] Aufgrund dieses komplexen Prozesses sind die Kosten für die Aufreinigung sehr hoch. Abhängig von der Produktionskapazität können diese zwischen 45% und 70% der gesamten Produktionskosten betragen.^[30]

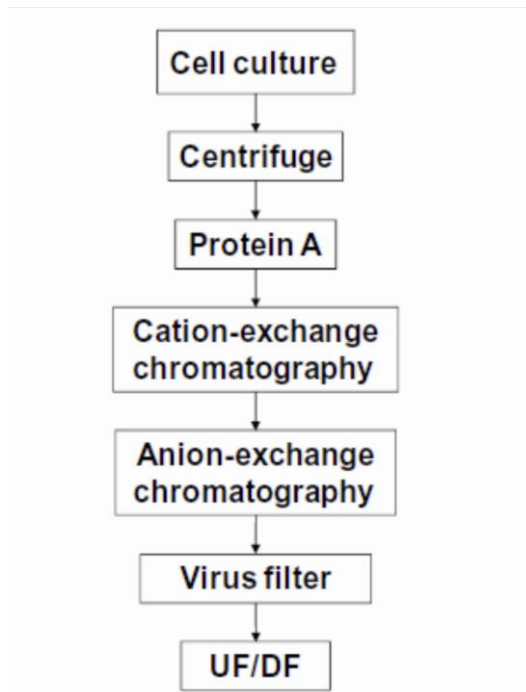


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des Aufreinigungsprozesses für Antikörper.^[29]

Der erste Schritt des derzeit durchgeführten Aufreinigungsprozesses ist eine Zentrifugierung der Zellkulturlösung. Dabei erfolgt die Trennung der Zellmembran von der Protein-Lösung.^[28] Dieser Schritt ist notwendig, damit die Zellmembranen nicht die nachfolgende Affinitätschromatographiesäule verstopfen. Alternativ zur Zentrifugierung können in diesem Schritt auch Filtrationsverfahren zum Einsatz kommen. Geeignete Verfahren sind Rotationsfiltration, welche die Eigenschaften von Zentrifugen und Filter kombinieren, und die Hohlfaserfiltration.^[28,30]

Bei der Affinitätschromatographie wird Protein A als Affinitätsmaterial verwendet. Protein A ist ein Protein mit einer Größe von ca. 60 kg/mol. Es wird in der Zellwand von *Staphylococcus aureus* gebildet und bindet mit hoher Affinität am Fc-Bereich von Antikörpern.^[31,32] Für die Affinitätschromatographie wird das Protein A auf einem polymeren Material immobilisiert. Das Material kann dabei z.B. Agarose oder Polyamid sein.^[32,33] Immobilisiert wird das Protein über eine kovalente Bindung zu aktiven Gruppen, die auf der Oberfläche des Polymer eingeführt werden. Als reaktive Gruppen können dazu Carboxyl-, Amino-, Phenol- oder Imidazolgruppen verwendet werden.^[33] Nach der Immobilisierung hat das entstandene Säulenmaterial eine Kapazität von 50 mg/g Säulenmaterial.^[34] Das Material wird dann in Chromatographie-Säulen gepackt und die Affinitätschromatographie wird unter HPLC-Bedingungen durchgeführt. Als Methode wird hierfür die sogenannte „Bind and Elute“-Methode verwendet.^[34] Dabei wird die Antikörperlösung durch die Säule geleitet und die Antikörper werden durch das Protein A gebunden. Als Resultat aus diesem Schritt erhält man im Idealfall eine antikörperfreie Lösung. Danach erfolgt ein Waschvorgang, bei dem

schwach gebundene Proteine ausgewaschen werden. Im Anschluss daran werden die Antikörper mit einer Lösung mit niedrigem pH-Wert eluiert.^[29,32,34]

Durch die harschen HPLC-Bedingungen und dem niedrigen pH-Wert bei der Elution ergibt sich das Problem, dass die Protein A Säulen „ausbluten“. Das heißt, dass bei jeder Elution geringe Mengen an Protein A aus der Säule gespült werden.^[35] Daraus ergibt sich, dass nach diesem Schnitt die Antikörper noch nicht vollständig rein sind. Die maximale Reinheit nach diesem Schritt 95%-98%.^[36]

Deshalb folgen noch Ionenaustauscherschritte, dass sogenannte „Polishing“, polieren der Antikörper. Dabei werden neben dem „ausgebluteten“ Protein A, noch Reste von DNA, Proteine der Wirtszellen und Endotoxine entfernt. Hierbei wird nicht mit der „Bind and Elute“, sondern mit einer Durchfluss-Methode gearbeitet.^[29,34] Zuerst wird die Antikörperlösung durch einen Anionenaustauscher geleitet. Dabei werden alle Substanzen mit einer negativen Partialladung entfernt. Die Antikörper passieren diesen Ionenaustauscher ohne Wechselwirkungen einzugehen.^[29,34] Am Kationenaustauscher sind starke Wechselwirkungen mit den Antikörpern zu erwarten, daher werden die Bedingungen so gewählt, dass die Verunreinigungen ungebunden durchkommen und die Antikörper erst als zweite Fraktion aus dem Austauscher austreten.^[36]

Trotz der bisherigen Schritte ist es möglich, dass noch Viren in der Antikörperlösung vorhanden sind. Diese Viren haben einen hydrodynamischen Durchmesser von 18 – 26 nm und sind damit etwa ein Drittel größer als die Antikörper. Daher können diese mittels Filtration entfernt werden.^[37] Hierfür werden spezielle Virusfilter verwendet, die einen Rückhalt gegenüber Viren von $> 4 \log_{10}$ aufweisen und dabei mehr als 99% der Zielproteine durchlassen.^[37,38]

Als letzter Schritt wird noch einmal eine Ultrafiltration durchgeführt. Dieser Schritt ist zum Austausch des Puffers, zur Aufkonzentrierung und zur Formulierung der Antikörperlösung gedacht.^[34] Bei der Ultrafiltration werden Membranen mit einer Porengröße von 10 - 500 Å verwendet.^[39] Diese geringen Porengrößen stellen sicher, dass keine Antikörper während der Filtration verloren gehen.

2.2 Membranadsorber

Membranadsorber sind ein Format, welches die Säulenchromatographie mit gepacktem Bett ablösen kann. Dieses Format hat im Vergleich zur klassischen Säulenchromatographie einige Vorteile, da die Lösung durch Konvektion an die Bindungsstellen transportiert wird und nicht wie im klassischen Säulenmaterial durch Diffusion (Abb. 2.5). Dadurch entsteht ein geringerer Druckverlust und auch der durchflossene Weg ist selbst bei einem Membranstapel deutlich kleiner als beim klassischen Säulenmaterial. Zusätzlich ergibt sich für große Proteine eine größere spezifische Oberfläche, da diese durch ihre Größe nur sehr schwer oder gar nicht in die Poren von klassischem Säulenmaterial diffundieren können.^[34,40] Ein anderer großer Vorteil ist, dass Membranadsorber sich recht einfach hochskalieren lassen.^[41]

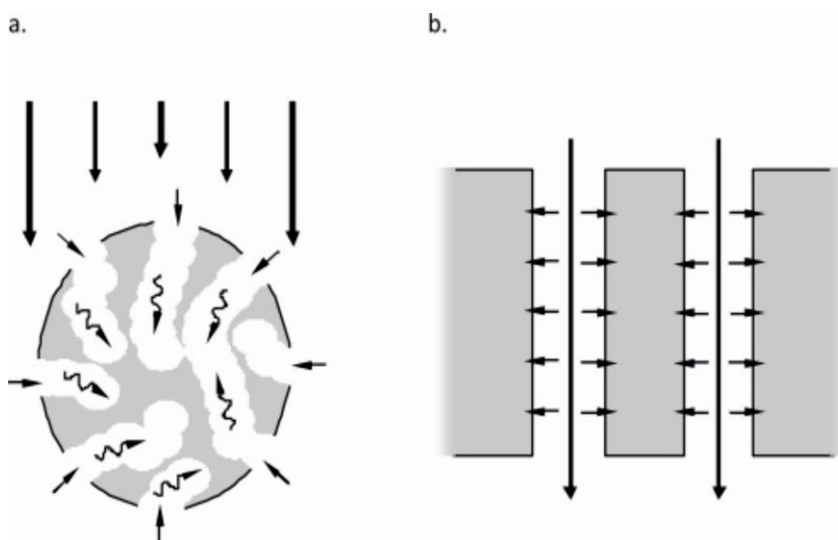


Abbildung 2.5 Vergleich des Flüssigkeitstransports durch a) ein klassisches Säulenmaterial und b) durch einen Membranadsorber.^[34]

Allerdings hat auch diese Technologie ihre Grenzen. Dabei gibt es vor allem Probleme bei der Porengrößenverteilung. Dabei weisen die Membranen meistens nicht nur eine Porengröße sondern viele auf. Des Weiteren muss auf die Membrandicke in Bezug auf den Druckverlust und eine einheitliche Flussverteilung geachtet werden.^[1] Dazu kommt noch, dass Membranadsorber meisten deutlich geringere Adsorptionskapazitäten aufweisen als klassische Chromatographiematerialien.^[42]

2.2.1 Adsorption an Oberflächen

Die Adsorption an Oberflächen kann auf unterschiedlichste Arten erfolgen. Dabei kann es sein, dass die Adsorption thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert ist. Auch gibt es noch die Unterscheidung zwischen Physisorption und Chemisorption. Bei der Chemisorption geht der adsorbierte Stoff eine Chemische Bindung mit der Oberfläche ein und ist dadurch sehr fest an die Oberfläche gebunden.^[43] Für Membranadsorber ist diese Art der Adsorption nicht interessant, da für die Elution zu große Energiemengen benötigt würden. Daher wird nur auf die verschiedenen Möglichkeiten der Physisorption eingegangen. Dabei handelt es sich um physikalischen Wechselwirkungen zwischen einem Adsorbent und der Oberfläche, welche durch „van der Waal's“ Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen oder durch Wasserstoff Brückenbindungen hervorgerufen werden.^[44] Besonders bei der Adsorption von Proteinen ist eine starke Abhängigkeit von der Oberflächen- und der Proteinbeschaffenheit zu beobachten. Das heißt, dass die Affinität eines Proteins zur Oberfläche von thermodynamischen Faktoren wie der Gesamtladung des Proteins, Partialladungen auf der Proteinoberfläche, der Anzahl an Gruppen auf der Oberfläche die Wasserstoff Brückenbindungen eingehen können und Anzahl der hydrophoben Flächen abhängt.^[45,46] Auch haben kinetische Aspekte einen große Einfluss auf die Adsorption an Oberflächen. Dabei spielen eine stabile Konformation und Struktur des Proteins, sowie die Anzahl und Anordnung von hydrophile bzw. hydrophoben Taschen eine große Rolle. Diese führen besonders bei polymeren Oberflächen zu größeren Affinitäten, da Polymere in diesen Taschen Wechselwirkungen eingehen können und dadurch gleichzeitig eine kinetische Stabilisierung der Bindung hervorrufen wird.^[47] In Abbildung 2.6 ist eine Proteinoberfläche mit unterschiedlichen Aktiven Gruppen und Taschen schematisch Dargestellt.

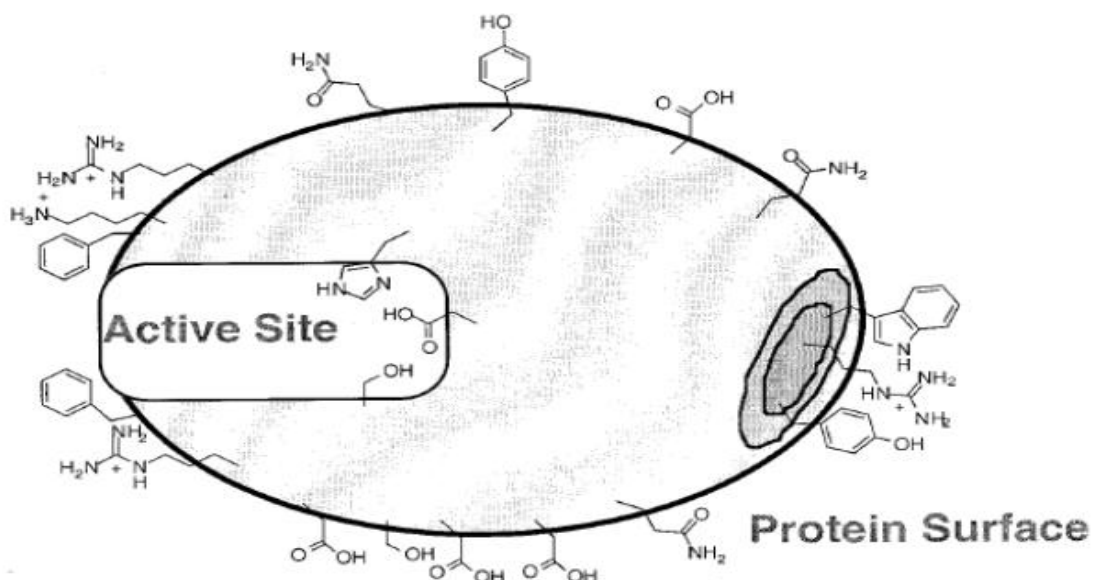


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung einer Proteinoberfläche.^[48]

Durch Anpassen der Parameter auf ein bestimmtes Protein, sind sehr hohe Affinitäten und Selektivität zu diesem möglich.^[45] Allerdings ist bei der Trennung von Proteinen, die sich in ihren physikalischen Eigenschaften sehr ähneln, eine sehr genaue Abstimmung der Proteinoberfläche und der Adsorberoberfläche nötig, um hohe Selektivitäten zu erhalten. Diese genaue Abstimmung kann sich aber als sehr schwierig herausstellen.^[49] Daher müssen bei den Membranadsorbern noch Klassifizierungen vorgenommen werden.

2.2.2 Klassifizierung von Membranadsorbern

Bei Membranadsorbern handelt es sich nicht um normale Membranen für Filtrationen, sondern um Membranen für chromatographische Aufgaben.^[34] Dabei tragen diese Membranen unterschiedlichste Liganden für die Adsorption von Biomolekülen. Diese Liganden können z.B.: Aminosäuren, Metall-Liganden, Ionenaustauscher oder Polymere sein.^[40,42,50,51,52] Als Membranadsorber werden meisten makroporöse Membranen verwendet, welche als unterschiedliche Module heute auf dem Markt sind. Diese Membranen werden als einfaches flaches Blatt bzw. mehrfach gestapeltes Modul, als spiralförmig gewickeltes Modul und als Hohlfaser Modul verkauft.^[51,52] Bei diesen Modulen handelt es sich um Membranen, die auf bestimmte Art in einem Gehäuse platziert sind und auf unterschiedliche Art in einem Prozess betrieben werden können (Abb. 2.7).^[8,21,52] Alle drei Typen haben dabei unterschiedliche Vorteile und Nachteile.

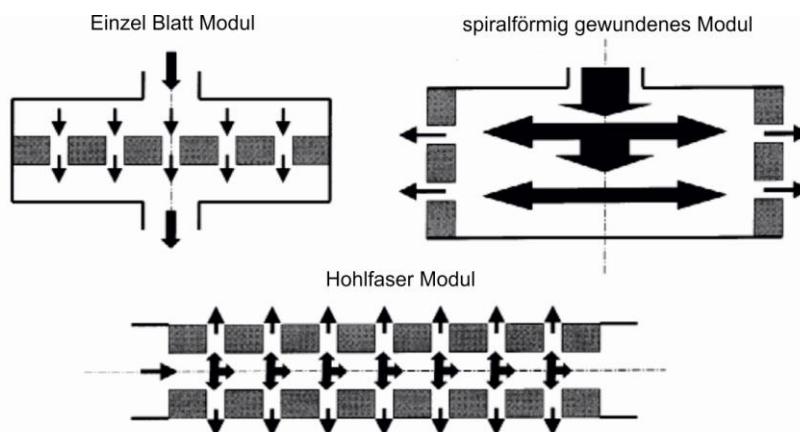


Abbildung 2.7 Fluss durch die unterschiedlichen Membran-Module^[51]

Bei den Modulen mit einem einfachen flachen Blatt bzw. mit mehrfach gestapelten Blättern ergibt sich der Vorteil, dass diese Module einfach herzustellen und zu handhaben sind. Sie führen abhängig von der Stapelgröße zu recht guten Bindungskapazitäten und zu recht scharfen Durchbruchskurven. Allerdings haben sie im Vergleich zu Hohlfasermembranen

eine kleinere spezifische Oberfläche. Trotzdem sind diese Module die derzeit am häufigsten im Einsatz befindlichen.^[51,52,53]

Die spiralförmig gewickelten Module sind dagegen besser geeignet, wenn es darum geht, Prozesse in großem Maßstab durchzuführen. Zusätzlich dazu sind sie sehr geeignet für Verfahren, die im „Bind and Elute“ Modus durchgeführt werden. Nachteil dieser Membranen ist ein, in radialer Richtung, starker und unvorhersehbarer Verlust der Durchflussgeschwindigkeit durch die Membran. Dieser Verlust ist bedingt durch die hohe spezifische Oberfläche. Trotzdem werden auch diese Membranmodule bei großen Firmen wie Satorius und Pall eingesetzt.^[51,52]

Die Hohlfasemodule haben im Vergleich zu den anderen Modulen eine Rohrgeometrie. Die Module selbst bestehen dabei aus vielen Hundert Hohlfasermembranen, die zu einem großen Bündel zusammengeführt sind. Dadurch erreichen diese Module ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen.^[51] Diese Membranmodule werden auf Grund ihrer Geometrie in der Durchflussmethode betrieben, wobei die Strömungsgeschwindigkeit im großem Maß variiert werden kann. Durch diese Betriebsweise ergibt sich dann auch das Problem dieser Membranen. Hohlfasermembranmodule sind für den „Bind and Elute“ Modus nicht geeignet. Dadurch sind sie nur bedingt als Adsorber zu gebrauchen.^[51,54]

Die Oberflächeneigenschaften von Membranadsorbern können in drei generelle Klassen aufgeteilt werden.

Eine Klasse sind Membranadsorber, die Eigenschaften von Ionenaustauschern haben und dadurch mit den Proteinen binden. Bei den Ionenaustauscherpolymeren kommt es zu einer elektrostatischen Bindung zwischen Protein und Membran. Dabei wird die Proteinbindung, und damit verbunden das Trennverhalten dieser Adsorber, über die Ladungsdichte der Oberflächen und über die Ladung pro Proteinmolekül bestimmt.^[40] Als Faustregel gilt dabei: Je höher die Ladungsdichte der Oberflächen umso besser bindet ein Ionenaustauscher mit Proteinen, die eine hohen Ladung pro Proteinmolekül haben.^[55] Mit dieser Eigenschaft lassen sich mit diesen Ionenaustauschern gute Selektivitäten erreichen, sofern die zu trennenden Substanzen unterschiedliche Oberflächenladungen haben. Als weiterer Vorteil dieser Methode ist eine große Bindungsstärke zwischen Protein und Ionenaustauscher. Zusätzlich dazu kann die Bindung, ohne das Protein zu zerstören, nur durch Zugabe von größeren Mengen an Salzen gebrochen werden. Deshalb sind Ionenaustauscher eine sehr Proteinschonende Adsorptionsmethode.^[49,56]

Die zweite Klasse von Adsorbern weisen an ihrer Oberfläche sehr viele hydrophile oder hydrophobe Ketten auf. Diese Methode beruht darauf, dass es auf der Proteinoberfläche unterschiedliche Domänen gibt. Diese Domänen haben entweder einen hydrophilen oder einen hydrophoben Charakter.^[57,58] Bei dieser Adsorptionsmethode wird die Adsorberoberfläche so angepasst, dass sie mit den hydrophilen oder den hydrophoben

Domänen auf der Proteinoberfläche wechselwirken kann. Auch mit dieser Methode können Proteine wieder selektiv adsorbiert werden. Auch hierbei gilt wieder, je ähnlicher sich die Proteine sind, umso schwieriger wird es, eine gute Selektivität zu erreichen, da für eine gute Selektivität eine genau Abstimmung der Adsorbers und der Elutions-Lösung auf die Domänen des Proteins erforderlich ist.^[59]

Die dritte Klasse von Membranadsorbern ist mit spezifischen Haftgruppen für einzelne Aminosäuren oder Proteine ausgestattet. Bei diesen Adsorbern werden die Haftgruppen speziell auf die Zielsubstanzen abgestimmt.^[49,50] Diese spezifische Abstimmung kann auf verschiedene Arten erfolgen. Zum einen gibt es Ansätze, Selektivitäten mittels spezifischen Polymeren einzuführen. Bei diesen findet die Bindung nicht an einer beliebigen Stelle auf der Proteinoberfläche statt, sondern nur mit bestimmten Aminosäuren..^[49,50] Ein anderer Ansatz ist das molekulare Prägen von Polymere. Dabei erfolgt eine vernetzte Polymerisation in Gegenwart des Ziel-Proteins (siehe Abschnitt 2.4).^[5,60,61]

2.3 Oberflächenfunktionalisierung von Membranen

Die Modifizierung von Membranoberflächen kann zu verschiedenen Zwecken genutzt werden. Zum einen kann sie dazu dienen, die Membran vor Ablagerungen, welche die Membranleistung verringern, zu schützen.^[62,63,64] Auch können Oberflächen-Modifizierungen die Stabilität der Membranen gegenüber korrosiven Umgebungen erhöhen.^[65,66,67] Eine andere Möglichkeit, was mit der Oberflächenmodifizierung von Membranen erreicht werden kann, ist das Einführen von schaltbaren Poren. Mit Hilfe dieser Modifizierung kann dann eine Membran für die Trennung von mehreren unterschiedlich großen Substanzen verwendet werden.^[68]

Auch für Membranadsorber ist die Oberflächenmodifizierung interessant, da die wenigsten Membranen bereits selektive Adsorbereigenschaften besitzen. Diese im Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Eigenschaften können auf den Membranoberflächen mittels verschiedener Funktionalisierungen eingeführt werden.^[40,49,63,69] Wie eine Oberflächenmodifizierung durchgeführt wird ist dabei nicht konkret festgelegt. Allerdings fällt die verwendete Methode normalerweise in eine dieser drei Kategorien, „grafting to“, „grafting from“ und „Reaktiv Beschichten“.^[1,65] Da das Reaktiv Beschichten und das „grafting to“ in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielen, werden diese nur kurz erklärt.

„Reaktiv Beschichten“ bezeichnet eine Methode bei der in der Regel ein Polymerfilm auf der Membran fixiert wird. Die Bindung zwischen Membran und Beschichtung ist dabei häufig von physikalischer Natur, es gibt aber auch Methoden, bei der es zu einer chemischen Bindung kommt. Dabei kann die Beschichtung der Membranen mit den meisten heute gängigen physikalischen Beschichtungsmethoden durchgeführt werden. Häufig werden dabei Methoden wie das „Dip-Coating“ oder das „Spin-Coating“ eingesetzt.^[42,67,70,71] Dabei wird die

Beschichtung meisten mittels physikalischer Bindung auf der Membran fixiert. Die Bindungsstärke ist bei diesen Methoden dementsprechend gering. Die Bindungsstärke kann allerdings variiert werden, indem die Membran und das Polymer so ausgewählt werden, dass es möglichst viele Wechselwirkungen zwischen dem Polymer und aktiven Gruppen auf der Membranoberfläche gibt.^[44,45,46,47] Des Weiteren können auf diese Weise Membranen mit funktionalen Polymeren beschichtet werden, welche auf chemischem Weg nur schwer zugänglich wären.^[1] Allerdings gibt es auch chemische Beschichtungsarten. Bei diesen Arten wird die Beschichtung chemisch an die Oberfläche gebunden. Diese Methoden sind plasmainduzierte Polymerisationen oder CVD (Chemische Dampf Abscheidung). Allerdings herrschen bei diesen Methoden recht harsche Bedingungen vor, daher sind sie nicht für alle Membranen geeignet.^[72,73]

Unter dem Begriff „Grafting to“ werden direkten Reaktionen von einem Reaktanden (meistens einem Polymer) mit der Membranoberfläche zusammengefasst. Zusätzlich wird auch das Einführen von reaktiven Gruppen als „Grafting to“ beschrieben. Heterogene Reaktionen von der Membran mit einem Polymer sind ein gutes Beispiel für „Grafting to“. Bei diesen Reaktionen handelt es sich um chemische Reaktionen zwischen reaktiven Gruppen auf der Membran mit einem Polymer, das endständige reaktive Gruppen besitzt. Bei solchen Reaktionen wird die Struktur des Polymers beibehalten. Allerdings muss bei diesen Reaktionen eine gewisse Anzahl von reaktiven Gruppen, wie z.B.: Epoxid-, Carboxyl-, oder Amino-Gruppen, auf der Membranoberfläche vorhanden sein, und die Reaktion sollte dabei möglichst keine Veränderung der Morphologie der Membran hervorrufen.^[1,74]

„Grafting to“-Reaktion sind dabei nicht allein auf Membranoberflächen beschränkt, sondern können auf allen möglichen Oberflächen stattfinden, wie zu Beispiel auf Latex-, Silika-Partikel oder auf der Wand von Kohlenstoff-Nanoröhrchen.^[74,75,76,77] „Grafting to“-Reaktionen können auf unterschiedlichste Art gestartet werden. Es ist möglich, die Reaktanden dabei so zu wählen, dass die Reaktion ohne Initiierung bzw. mit einer geringen Temperaturerhöhung gestartet wird. Allerdings können diese Reaktionen aber auch mit Hilfe von einem Katalysator, Plasma oder durch Bestrahlung gestartet werden. Bei der Wahl der Initiierung sollte darauf geachtet werden, welche dieser Methoden für die Oberfläche nicht schädlich ist.^[1,72,75,76,77,78]

2.3.1 „Grafting from“-Methode

Bei der „Grafting from“-Methode handelt es sich um eine direkte Pfropfungspolymerisation auf der Membranoberfläche. Mit dieser Art der Funktionalisierung können leicht Polymere auf Membranoberflächen aufgebracht werden. Diese Methode ist für die meisten Membranen anwendbar und läuft unter entsprechenden Reaktionsbedingungen sehr selektiv ab.^[1,74] Beim „Grafting from“ werden nicht unbedingt Membranen mit speziellen reaktiven Gruppen benötigt. Die Initiierung kann unter verschiedensten Bedingungen gestartet werden. Einige dieser Initiierungsbedingungen sind recht harsch und können auf der Membranoberfläche reaktive Stellen entstehen lassen.

Die Initiierung erfolgt dabei entweder mit Hilfe eines Elektronenstrahls, eines Plasmastrahls oder aber abhängig vom Polymer ist auch eine solche Initiierung mittels UV-Strahlung möglich.^[1,79,80,81] Allerdings muss bei dieser Art der Initiierungen darauf geachtet werden, dass sie die Membran nicht beschädigt, sondern nur die Polymerisation an der Oberfläche aktiviert.^[1,74] Diese harschen Initiierungen sind aber nicht die einzigen, mit der eine „Grafting from“-Reaktion gestartet werden kann. Bei den anderen Methoden wird in der Regel die Reaktion mit einem Initiator gestartet. Dieser Initiator kann auf unterschiedliche Arten reagieren. Dabei kommt es auf den Initiator an, wie die Reaktion gestartet wird. Einige Initiatoren reagieren auf Wärme wie z.B. Azo-Verbindungen, andere auf UV-Strahlung wie z.B. Benzophenon oder wieder andere auf chemische Verbindungen, die auf der Oberfläche immobilisiert sind.^[49,82,83] Der Starter kann dabei direkt auf der Oberfläche immobilisiert sein oder in Lösung vorliegen. Die Varianten mit der eine Pfropf-Polymerisation gestartet werden kann sind sehr vielfältig. Es ist auch möglich den Initiator dabei chemisch oder physikalisch auf der Oberfläche zu fixieren.^[82,84] Genau wie es möglich ist, die Reaktion aus der Lösung heraus zu initiieren.^[49]

In den meisten Fällen erfolgt die Pfropf-Polymerisation radikalisch. Je nach Art der Initiierung kann die Polymerisation dann mehr oder weniger kontrolliert ablaufen.^[82,85] Allerdings gibt es keine Beschränkung auf radikalische Polymerisationen. Es sind auch ionische Polymerisationen möglich. Dabei können sowohl kationische als auch anionische Polymerisationen mit sehr hoher Kontrolle durchgeführt werden.^[86,87] Eine beliebte, sehr kontrollierte, lebende radikalische Polymerisation ist die ATRP. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, wobei ein Gleichgewicht zwischen einer aktiven Spezies (Radikal) und einer inaktiven Spezies (Alkylhalogenid) vorliegt. Dieses Gleichgewicht liegt dabei stark auf der Seite der inaktiven Spezies. Durch diese Verschiebung des Gleichgewichts werden zum einen Terminationsreaktionen unterdrückt und die Reaktion selbst wird verlangsamt. Die Kontrolle dieser Reaktion erfolgt über ein komplexes Verhältnis von Übergangsmetallkomplexen, welche die Reaktion katalysieren. Bei einer genauen Einstellung dieses Verhältnisses ist die ATRP eine sehr gut kontrollierte

Reaktion mit der „grafting from“ durchgeführt werden kann.^[82,88,89] Andere kontrollierte Methoden, die auf der UV-Initiierung basieren, werden in Abschnitt 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben.

2.3.2 „Synergist Immobilisierung“

Die „Synergist Immobilisierung“ ist eine UV-Initiierte „grafting from“-Methode. Bei dieser Methode wird eine reaktive Gruppe auf die Oberfläche einer Membran immobilisiert. Der Photoinitiator wird zur Reaktionslösung hinzugefügt. Dabei muss die Reaktionslösung und die Membran so abgestimmt werden, dass die Reaktion nur an der Reaktivengruppe initiiert werden kann. Die reaktiven Gruppen sind im Fall der „Synergist Immobilisierung“ eine aktivierte CH_2 -Gruppe.^[2] Die Aktivierung der CH_2 -Gruppe erfolgt dabei durch ein angrenzendes Stickstoffatom (Abb. 2.8) oder durch ein Sauerstoffatom. Das heißt, bei der „Synergist Immobilisierung“ müssen Membranen verwendet werden, die keine aktivierten CH_2 -Gruppen enthalten, da es sonst zu einer unkontrollierten Polymerisation kommt. Wenn diese Methode bei solchen Membranen verwendet werden soll, muss vor der Reaktion eine Schicht aufgebracht werden, die diese Gruppen abschirmt. Eine solche Schicht kann z.B. eine Polyacrylschicht sein.^[90] Auf den Membranen bzw. den abschirmenden Schichten muss dann eine kontrollierte Menge an CH_2 -Gruppen eingeführt werden. Diese werden in der Regel durch DEEDA eingeführt. Dabei reagiert das Amin DEEDA mit der Oberfläche und führt eine Spaltung durch.^[2,49,90] Eine solche Reaktion, für eine PET-Oberfläche, ist in Abbildung 2.8 aufgetragen.

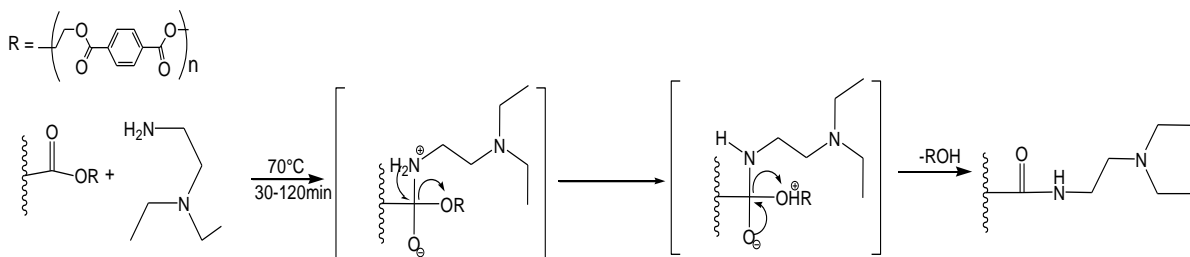


Abbildung 2.8 Immobilisierung der Reaktiven-Gruppen auf einer PET-Oberfläche.

Die Initiierung der Reaktion erfolgt dann durch einen der Reaktionslösung zugesetzten Photoinitiator. Dabei wird hierzu meistens Benzophenon verwendet.^[2,49,90] Benzophenon ist ein doppelt Aromatisches Keton, welches als sogenannter „Typ II“ Photoinitiator reagiert. Dieser Initiator abstrahiert nach UV-Aktivierung ein Wasserstoff Atom mittels homolytischer Spaltung. Dadurch bildet sich ein Radikal aus der CH_2 -Gruppe, woraus dann eine CH^\bullet -

Gruppe entsteht. Ein weiteres Radikal bildet sich am Benzophenon. Dieses Radikal ist aber aufgrund des positiven mesomeren Effekts der aromatischen Ringe und dem negativen induktiven Effekt des Sauerstoffs stabilisiert. Durch diese Stabilisierung bildet das Benzophenon so gut wie keine weiteren Radikale und es führt nur zu einem geringen Anteil an Nebenprodukten. Die Initiierung der Polymerisation erfolgt dadurch hauptsächlich direkt auf der Membranoberfläche.^[1,2,91,92] Abbildung 2.9 zeigt eine solche UV-Initiierte Radikalbildung an einer CH₂-Gruppe von immobilisierten DEEDA.

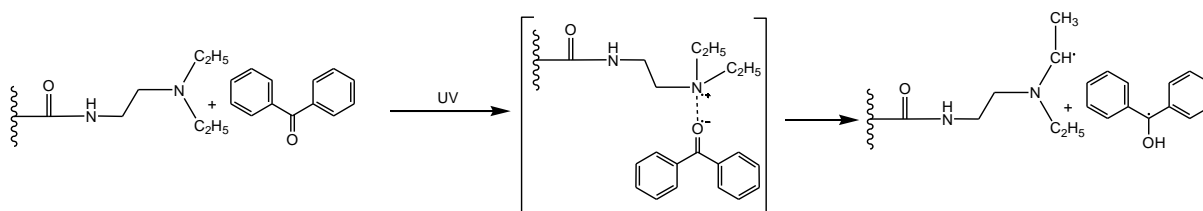


Abbildung 2.9 Mechanismus der UV-Initiierung

Die Polymerisation selbst läuft als unkontrollierte radikalische Reaktion ab. Ein gewisses Maß an Kontrolle wird über die definierte Oberflächeninitiierung gegeben. Die Kontrolle bewirkt aber nur, dass die Polymere von der Oberfläche an wachsen und dass es keine ungewollte Vernetzung gibt. Diese Methode ist daher gut geeignet, um Bürstenstrukturen auf Oberflächen aufzubringen. Auch können statistische oder selbst organisierende Copolymere mit dieser Methode aufgebracht werden. Allerdings können definierte Block-Copolymere mit dieser Methode nicht hergestellt werden, da sie keinen lebenden Charakter hat und es nach einer bestimmten Reaktionszeit zu Terminierungsreaktionen kommt.^[2,49]

2.3.3 „RAFT“

„RAFT“ ist die Abkürzung für Reversible Additions Fragmentierungs Ketten Transfer Polymerisation. Die „RAFT“-Methode ist eine kontrollierte lebende radikalische Polymerisationsmethode. Diese Methode kann für eine große Anzahl an verschiedenen Monomeren verwendet werden, da sie tolerant gegenüber vielen funktionalen Gruppen ist.^[93,94] Die Kontrolle dieser Reaktion wird dabei durch den sogenannten „RAFT-Agent“ erreicht. Dieser „RAFT-Agent“ ist dabei gewöhnlich eine Thiocarbonylschwefel Verbindung, welche zu einer hohen Reaktionskontrolle führt, wenn die Verbindung auf die verwendeten Monomere abgestimmt wird.^[94,95] Auch ist es möglich, mit dieser Polymerisationsmethode verschiedenen Polymer Architekturen zu erreichen. Dabei ist es auch möglich, anders als bei der „Synergist Immobilisierung, Block-Copolymere zu bilden.“^[94,95,96] Die Polymerisation mittels „RAFT“-Technik erfolgt in fünf Schritten (Abb. 2.10). Der erste Schritt ist dabei die Initiierung. Hierbei werden Radikale erzeugt, die mit dem „RAFT-Agent im zweiten Schritt reagieren. Der „RAFT-Agent“ ist nicht dazu in der Lage, selbst Radikale zu bilden.

Die Initiierung kann dann auf unterschiedlichste Arten erfolgen. Die Auswahl ist nicht beschränkt und es können alle herkömmlichen Methoden, wie thermische Radikalstarter, UV-Strahlung, γ -Strahlen oder Plasma verwendet werden.^[93,97] Das Initiatorradikal reagiert mit einem Monomer, unabhängig davon, ob es sich um eine Pfropf-Polymerisation oder eine Lösungspolymerisation handelt.^[94,98,99]

Im zweiten Schritt des Prozesses reagiert dann der „RAFT-Agent“ mit dem initiierten Radikal. Der Unterschied zwischen Pfropf-Polymerisation und einer Lösungspolymerisation ist hierbei der „RAFT-Agent“. Bei Lösungspolymerisationen liegt dieser frei in der Lösung vor, während der „RAFT-Agent“ bei Pfropf-Polymerisationen im Gegensatz dazu an der Oberfläche gebunden ist.^[98,99,100] Durch die Reaktion mit dem Radikal fragmentiert dann der „RAFT-Agent“ in ein freies Radikal und ein terminiertes Ende. Bei dieser Fragmentierung handelt es sich um einen reversiblen Prozess.^[94,96] Das frei gewordene Radikal kann dann entweder ein Monomer initiieren oder wieder mit dem terminierten Ende reagieren.

Der dritte Schritt der Polymerisation ist die Initiierung eines Monomers durch das freie Radikal. Dieses Monomer-Radikal reagiert dann im nächsten Schritt wieder mit einem „RAFT-Agent“. Die Reaktion kann dabei an einem bisher noch nicht reagierten „RAFT-Agent“ (IV a) stattfinden, oder aber an einem schon reagierten (IV b). Im Anschluss an die Addition eines Radikals an den „RAFT-Agent“ erfolgt dann wieder die Fragmentierung. Dabei wird dann wieder ein Radikal freigegeben und es folgt wieder Schritt drei. Das Kettenwachstum bei der „RAFT“-Polymerisation erfolgt dann in einem Kreislauf zwischen Schritt III und IV b. Der fünfte Schritt ist dann die Terminierung. Diese erfolgt, wenn zwei Radikale miteinander reagieren.^[93,94,95,96]

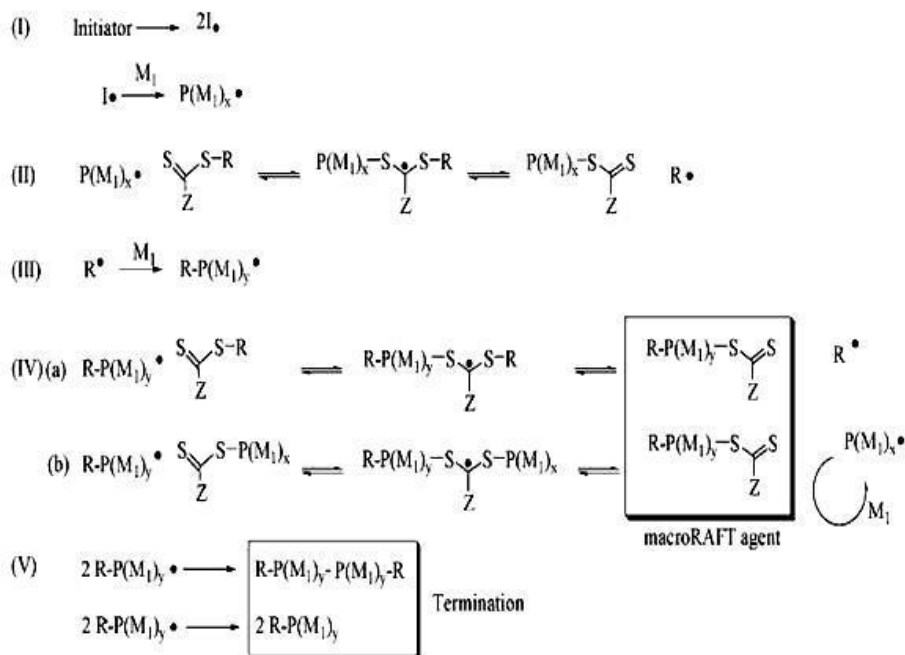


Abbildung 2.10 Reaktionsschritte einer „RAFT“-Polymerisation.^[94]

Wie bereits erwähnt, liegt ein besonderes Augenmerk auf dem „RAFT-Agent“. Diese sind Thiocarbonylschwefelverbindungen, welche eine R-Gruppe und eine Z-Gruppe besitzen. Diese Gruppen können sehr unterschiedlich gewählt werden. Für die Z-Gruppe können Aromatische-Verbindungen, Methyl-Gruppen, Pyridine, Laktame, tertiäre-Amine, Thioether und Ether-Gruppen verwendet werden. Die R-Gruppe kann aus Aromaten, Cyanaten, Estern und Ethern und aus Mischungen dieser Gruppen bestehen. Die Kombination dieser Gruppen ist dabei abhängig vom verwendeten Monomer. Als Beispiel wird für die Polymerisation von Acrylaten häufig ein „RAFT-Agent“ verwendet, der als Z-Gruppe eine Phenylgruppe und als R-Gruppe eine Methyl-Phenyl-Gruppe enthält.^[93,96,101] Dabei ist der „RAFT-Agent“ aber immer so aufgebaut, dass die R-Gruppe, nach der Aktivierung durch ein Radikal als Austrittsgruppe fungiert.^[93,96,98,99] Aufgrund des Aufbaus des „RAFT-Agent“ gibt es jetzt für Pfpf-Polymerisationen zwei Möglichkeiten. Dabei kann der „RAFT-Agent“ mit der R-Gruppe oder mit der Z-Gruppe an der Oberfläche gebunden werden. Diese Bindung bestimmt dann wieder wie die Polymerisation abläuft und wird dann je nach gebundener Gruppe, R-Gruppen Ansatz bzw. Z-Gruppen Ansatz genannt.^[94,98] Bei Z-Gruppen Ansatz ist der „RAFT-Agent“ über die Z-Gruppe an einer Oberfläche gebunden. Weitaus häufiger wird aber der R-Gruppen Ansatz verwendet. Bei diesem ist die R-Gruppe auf der Oberfläche verankert und zwei „RAFT-Agenten“ werden dabei über eine Z-Gruppe verbrückt. Diese Verbrückung dient der Erhöhung der Kontrolle der Reaktion, wird aber nicht immer durchgeführt. Bei dem R-Ansatz bleibt die radikalisch aktivierte R-Gruppe auf der Oberfläche gebunden, während sich der Rest des „RAFT-Agents“ am Ende der Polymerkette befindet. Durch diese Methode können Pfpf-Polymere mit spezifischen Endgruppen versehen werden.^[98,101,102,103,104]

2.4 Molekular Geprägte Polymere

Molekular geprägte Polymere sind Materialien, die Kavitäten enthalten, welche genau auf ein bestimmtes Molekül abgestimmt sind. Der Aufbau dieser Kavitäten ist dabei die negative Form des Zielmoleküls im Bezug auf Größe, Form und chemische Funktionalität.^[105] Die Herstellung dieser Polymere kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

Bei der klassischen Methode werden bei der Polymerisation die Ziel-Moleküle als Templat zur Reaktionslösung hinzugegeben. Diese Reaktionslösung besteht dabei aus funktionalen Monomeren, welche mit dem Zielmolekül in Wechselwirkung stehen, und Monomeren die das Polymer vernetzen (Abb. 2.11). Die funktional Monomere Wechselwirken während der Reaktion mit dem Zielmolekül und bilden dadurch eine definierte Struktur um das Zielmolekül. Diese Struktur wird dann durch die Vernetzermomere fixiert. Dabei werden die Vernetzermomere so gewählt, dass sich die Struktur noch etwas bewegen kann. Durch diesen Bewegungsspielraum kann dann das Ziel-Molekül wieder desorbiert werden.

Dadurch entstehen Materialien, mit denen ein Ziel-Molekül spezifisch adsorbiert und desorbiert werden kann.^[5,105,106,107]

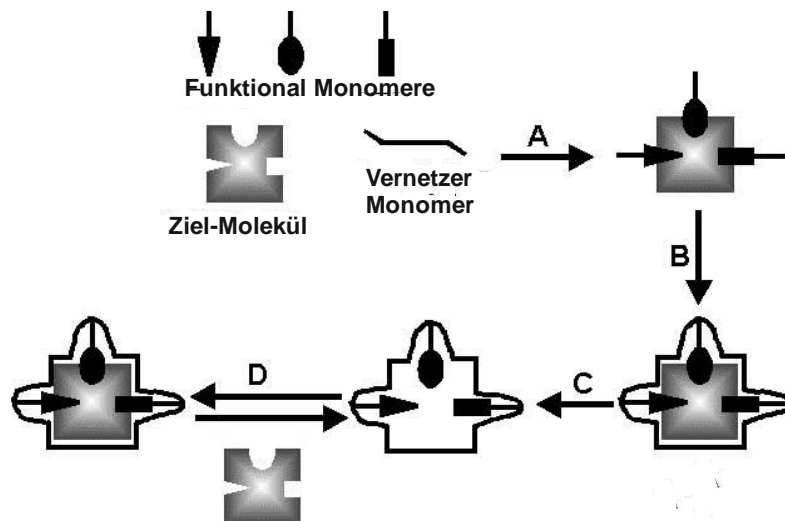


Abbildung 2.11 Schematische Darstellung der Herstellung von MIPs.^[105]

Eine weitere Methode für das molekulare Prägen von Polymeren ist der Epitopansatz. Dieser Ansatz ist von der Funktionsweise gleich dem klassischen Ansatz. Der Unterschied besteht darin, dass nicht das Zielmolekül bei der Reaktion anwesend ist, sondern nur ein kleiner Teil dieses Moleküls. Dieser Ansatz wird häufig verwendet, wenn das Ziel-Molekül nur an einer bestimmten Stelle gebunden werden soll. Wie z.B. bei der Antikörperaufreinigung, wenn der Antikörper nur an der Fc Kette gebunden werden soll. Diese kleineren Moleküle haben dabei auch noch den Vorteil, dass sie mehr Bindungsstellen generieren können als die klassische Methode. Mit beiden Methoden können geprägte Polymere sowohl als Lösungspolymer als auch als Pfropfpolymer hergestellt werden.^[61,107,108,109]

Als dritte und letzte Methode gibt es noch das hierarchische Prägen. Dieser Ansatz unterscheidet sich von den anderen beiden Ansätzen. Bei hierarchischen Prägen wird das Ziel-Molekül auf einer Oberfläche (meisten Silika-Gel) adsorbiert (Abb. 2.12). Dieses Silika-Gel dient als Stützgerüst für die Polymerisation. Diese erfolgt dann an der Oberfläche. Auch hier wird wieder eine Mischung aus funktionalen und Vernetzermomeren verwendet. Diese Funktionalmonomere stehen dabei in Wechselwirkung mit dem Ziel-Molekül und die Vernetzer stabilisieren die Struktur. Nach der Polymerisation wird dann das gesamte Stützgerüst entfernt. Dadurch entsteht dann ein Polymer, das die Negativform des Silika-Gels hat. Dieses Polymer kann dann als Chromatographie-Material verwendet werden.^[110,111,112]

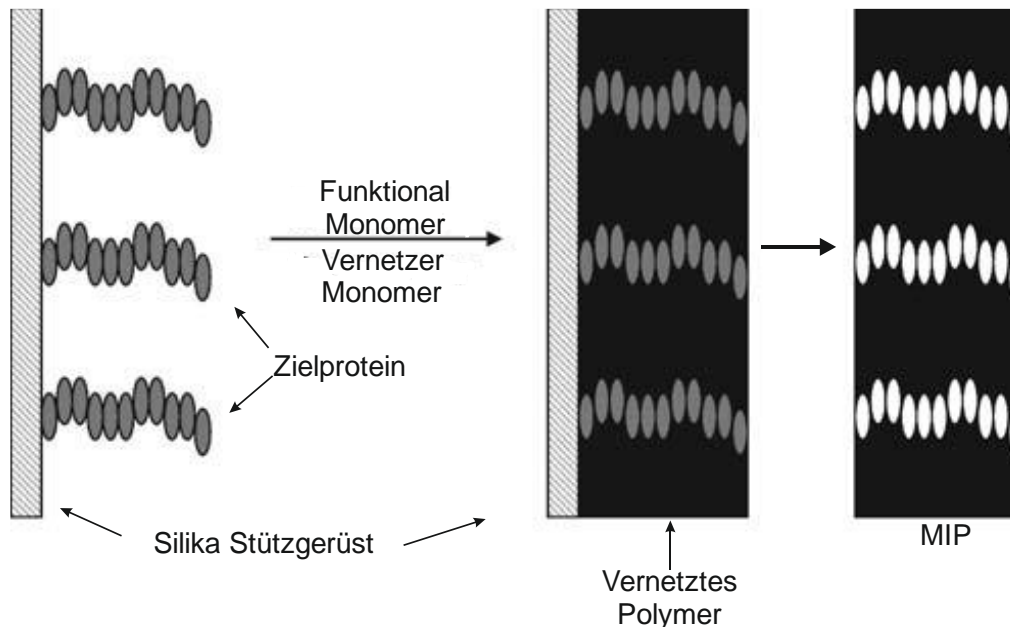


Abbildung 2.12 Schematische Darstellung der Herstellung von hierarchisch geprägten Polymeren.^[112]

3. Zielsetzung und Konzept

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung von Antikörperselektiven Membranadsorbern mit einer hohen Bindungskapazität. Weiter sollen diese Membranadsorber als Plattform für die kombinatorische Entwicklung von funktionalen Polymeren für die Antikörper Erkennung verwendet werden. Für die Entwicklung dieser Polymere sollte es dabei keine Rolle spielen, ob es sich um Funktionalpolymere oder um MIPs handelt. Diese Membranadsorber sollen eine hohe Affinität und Selektivität für IgG und andere mAbs aufweisen. Die Zielkapazität ist die einer Protein A Chromatographie Säule (30 - 40 mg/ml).

Das Konzept sieht dabei vor, dass eine Methode entwickelt wird einen „Typ I“ Photoinitiator auf Benzoinethylether Basis kovalent an der Membranoberfläche zu koppeln. Diese Kopplung soll auf unterschiedlichen Oberflächen möglich sein, daher werden PET-Kernspur Membranen (als Referenz) und Cellulose-Membranen (als Adsorber) verwendet. Abbildung 3.1 zeigt schematische mögliche Reaktionswege für die Immobilisierung des Photoinitiators auf Benzoinethylether Basis. Die Vorteile, die mit dieser Art der Photoinitiierung erreicht werden sollen, sind eine gute Kontrolle der Reaktion und eine geringe Produktion von Nebenprodukten. Das wird dadurch gewährleistet, dass die Polymerisation nur direkt an der Oberfläche stattfinden kann. Des Weiteren ist es ein Ziel, dass die Menge an gebildeten Nebenprodukten geringer ist als bei bereits etablierten Methoden, wie der „Synergist Immobilisierung“. Diese Verringerung der Nebenprodukte soll durch den ausgewählten Photoinitiator bewirkt werden. Zum einen zerfällt dieser Photoinitiator nach dem Bestrahlen in ein reaktives und ein stabilisiertes Radikal. Des Weiteren soll die Polymerisation in einem hydrophilen Lösungsmittel durchgeführt werden. Durch diese hydrophilen Bedingungen soll die Löslichkeit des stabilisierten Radikals eingeschränkt werden. Dadurch soll dafür gesorgt werden, dass nur wenige dieser Radikale gelöst werden und Nebenreaktionen starten können. Denn wenn die Radikale auf der Membranoberfläche verbleiben, stehen sie in Konkurrenz mit den kovalent gebundenen und aktiveren Radikalen.

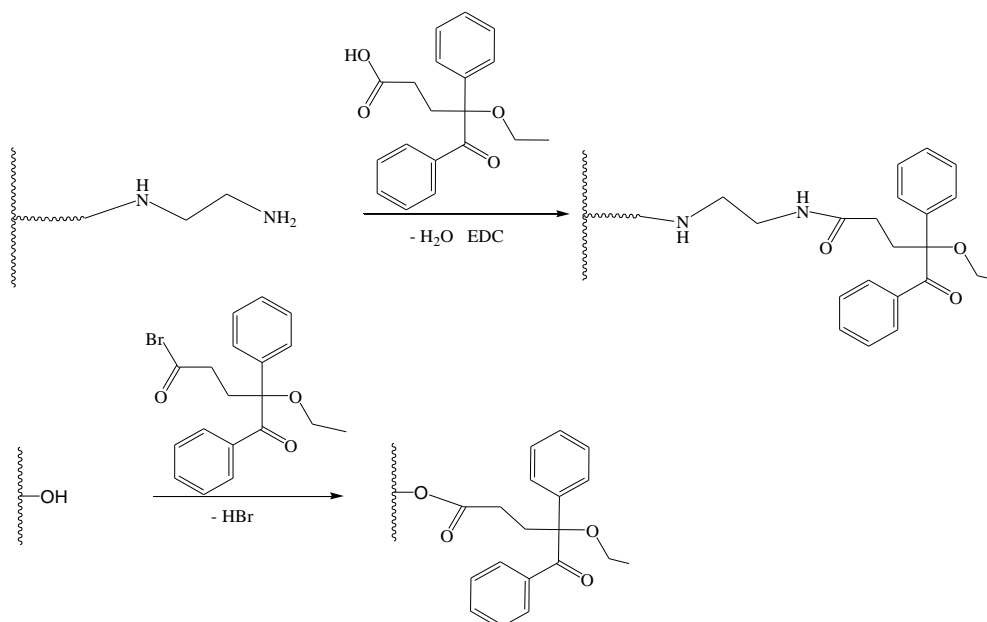


Abbildung 3.1 Reaktionen um einen "Typ I" Photoinitiator auf der Membranoberfläche zu immobilisieren.

Weiterhin soll mit dieser Methode die Pfropfdichte der Polymere kontrolliert werden. Die Einstellung der Pfropfdichte erfolgt über die Anzahl der Photoinitiatorgruppen auf der Membranoberfläche. Die Variation der Photoinitiatorgruppen kann durch geeignete „Abstandhalter“-Moleküle erfolgen. Dabei werden dann Photoinitiator und „Abstandhalter“-Molekül gleichzeitig auf der Membranoberfläche immobilisiert. Das „Abstandhalter“-Molekül blockiert dann mögliche Bindungsstellen und das führt zu einer Verringerung der Photoinitiatordichte auf der Oberfläche. Die Abbildung 3.2 zeigt ein mögliches Reaktionsschema für die Variation der Photoinitiatordichte. Das hierbei verwendete „Abstandhalter“-Molekül hat eine nominell höhere Reaktionsgeschwindigkeit. Die Reaktionsgeschwindigkeiten können während der Immobilisierung durch eine angepasste Zusammensetzung der Reaktionslösung ausgeglichen werden.

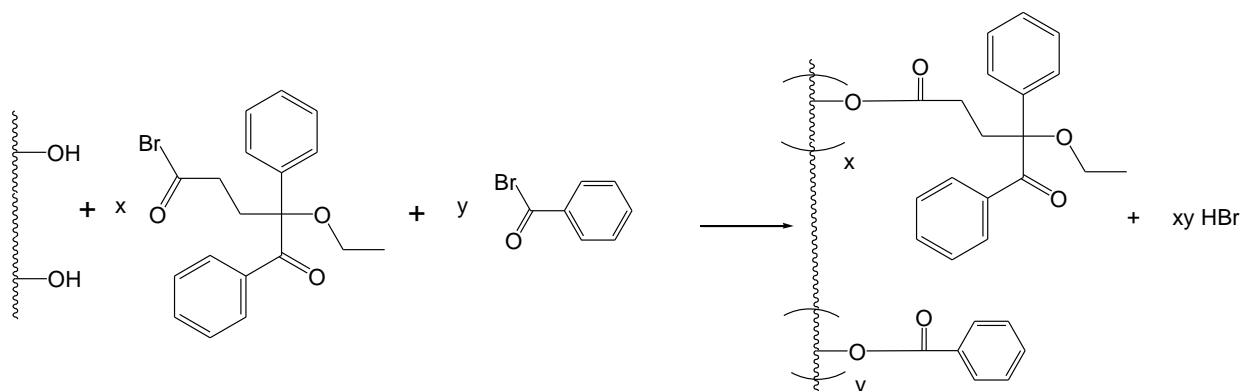


Abbildung 3.2 Reaktionsschema für die Variation der Photoinitiatordichte auf der Membranoberfläche.

Die Polymere, die den Membranadsorbern die hohe Affinität und Selektivität zu IgG verleihen sollen, werden aus speziellen Monomeren hergestellt. Die Monomere gehen selektive Bindungen zu bestimmten Aminosäuren ein. Diese Monomere sind von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schrader entwickelt worden und in Abbildung 3.3 aufgetragen.

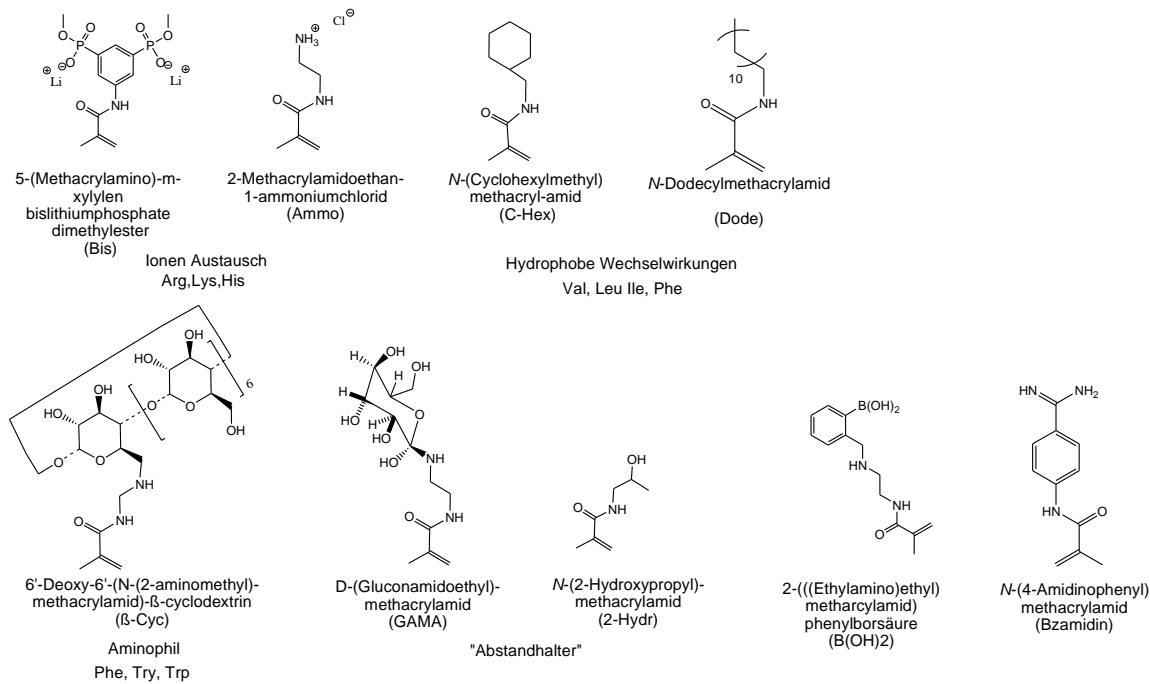


Abbildung 3.3 Aminosäuren selektive Monomere

Die spezifische Selektivität eines Teils dieser Monomere ist in der Literatur^[113] beschrieben. Durch Kombination dieser Monomere sollen die besten Polymere für die IgG Adsorption auf Membranoberflächen gefunden werden. Dazu gehört auch die Aufklärung der Polymer Zusammensetzung via ¹H-NMR und der Vergleich mit konventionellen Monomeren. Diese in Abbildung 3.4 dargestellten konventionellen Monomere dienen als Referenzmaterial.

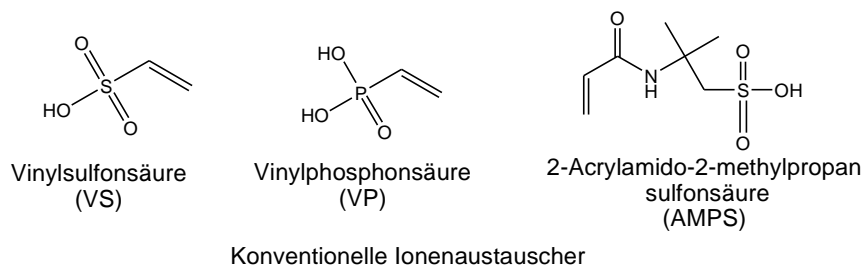


Abbildung 3.4 Konventionelle Monomere

Für die kombinatorische Entwicklung funktionaler Polymere für die Antikörpererkennung sollen die Membranen in ein kleines Format gebracht werden. Das Format soll dabei so gewählt werden, dass eine Membran in eine Kavität einer 96er Titerplatte passt. Dabei soll untersucht werden, ob es einen Einfluss des Formats auf die Polymerisation gibt. Mit diesem

Titerplatten-Format sollen dann Screeningtests mit unterschiedlichen Polymerisationsmischungen durchgeführt werden. Durch diese Tests sollen die Mischungen mit der höchsten Affinität und Selektivität, für makroporöse Membranadsorber gefunden werden.

Um die Zielkapazität zu erreichen, soll die Architektur der Polymere kontrolliert werden. Zum einen soll das durch die bereits beschriebene Variation der Photoinitiatordichte geschehen. Hierbei kann die Polymerstruktur zwischen Bürsten-Struktur und Pilz-Struktur verändert werden. Des Weiteren sollen sogenannte „Kamm ähnliche“-Strukturen aufgebaut werden. Diese Strukturen werden mehrstufig aufgebaut.

Grundlage für diese Strukturen bildet ein „Rückgrat“-Polymer, das auf die Membranoberfläche gepfropft wird. Dieses „Rückgrat“-Polymer besteht aus Monomeren mit Funktionalgruppen, die ein Koppeln von Photoinitiatoren zulassen. Abbildung 3.5 zeigt die Monomere, die zum Aufbau des Rückgrat-Polymers vorgesehen sind. Die Monomere sind so ausgewählt, dass sie gut reagieren und zu hohen Pfropfdichten führen können.

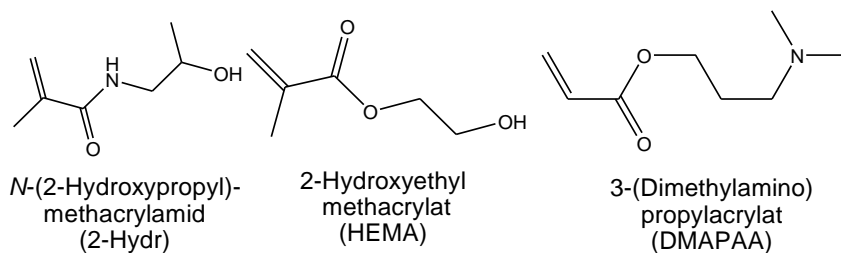


Abbildung 3.5 Monomere die, das Rückgrat-Polymer bilden.

An dieses Rückgrat-Polymer soll dann wieder Photoinitiator immobilisiert werden. Dadurch sollen mehr reaktive Stellen als auf der Membranoberfläche erreicht werden. An diesen reaktiven Stellen wird dann wieder das funktionale Polymer gepfropft. Dadurch wird eine „Kamm ähnliche“-Struktur erzielt. Diese Struktur soll dann wie in Abbildung 3.6 dargestellt, mehr IgG binden können als eine vergleichbare lineare Struktur.

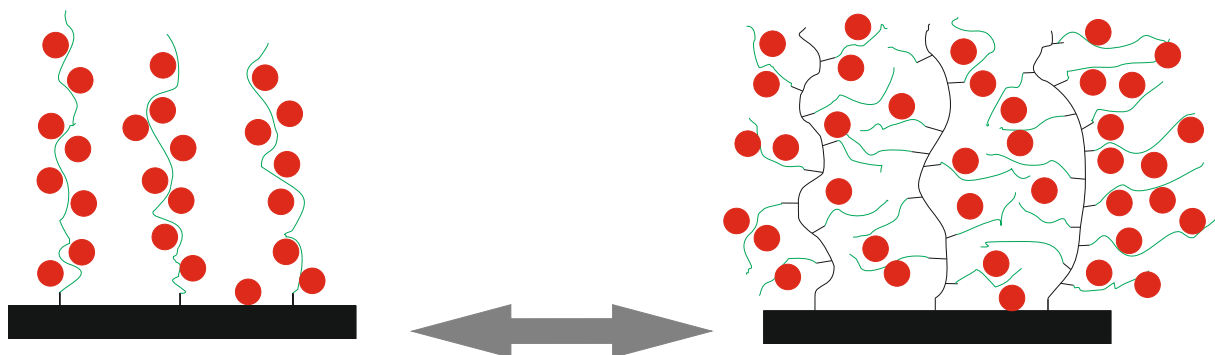


Abbildung 3.6 Adsorptionsverhalten lineare Struktur gegen „Kamm ähnliche“-Struktur
 schwarze Linien=Rückgrat-Polymer, grüne Linien=Funktionales-Polymer, rote Kreise=IgG

4. Experimentalteil

4.1 Synthesen

In diesem Abschnitt werden die durchgeführten Synthesen beschrieben. Hierbei werden nicht die Synthesen von allen verwendeten Monomeren beschrieben, da ein großer Teil der Monomere von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schrader zur Verfügung gestellt wurde.

4.1.1 Synthese von 5-(Methacrylamino)-*m*-xylolbislithiumphosphate dimethylester

Bei der Synthese von 5-(Methacrylamino)-*m*-xylolbislithiumphosphatedimethylester handelt es sich um eine 4 Stufen Synthese. Die ersten 3 Stufen der Synthese sind in der Literatur^[114] beschrieben und werden in dieser Arbeit ins Deutsche übersetzt. Änderungen im Syntheseverlauf werden beschrieben.

5-Nitro-*m*-xylol-bisphosphonsäuretetramethylester

In der ersten Stufe dieser Synthese werden 5-Nitro-*m*-xylol (63,0 mmol) in 165 ml Tetrachlormethan gelöst. N-Bromsuccinimid (139,5 mmol) und eine katalytische Menge von α,α' -Azobisisobutyronitril werden zur Reaktionsmischung hinzugegeben und die Mischung wird im Anschluss für 13 h unter Rückflussbedingungen gerührt. Im Anschluss daran wird das unlösliche Succinimid abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anders als in der Literatur^[114] beschrieben wurde in dieser Synthese das Rohprodukt nicht umkristallisiert. Das ölige gelbliche Rohprodukt (ca. 33 mmol) wird in Trimethylphosphite (100 mmol) gelöst und die Lösung wird 5 h unter Rückflussbedingungen gerührt. Das nicht reagierte Trimethylphosphite wird im Vakuum entfernt und das Produkt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt. Als feste Phase wird Silica-Gel verwendet und als Laufmittel wird Dichlormethan/Methanol (14/1 v/v, $R_f = 0,29$) verwendet. Nach Entfernen des Laufmittels aus der Produktfraktion wird ein gelber Feststoff erhalten (ca. 12 mmol, Ausbeute 19%).

5-Amino-*m*-xylol-bisphosphonsäuretetramethylester

Die zweite Stufe ist eine Hydrierung. Zu einer Lösung aus 5-Nitro-*m*-xylol-bisphosphonsäuretetramethylester (12 mmol), in 115 ml Dichlormethan wird Palladium-katalysator auf Aktivkohle (0,93 g, 10 % Pd = 93 mg, 0,9 mmol) zugegeben. Im Anschluss daran wird die Reaktionsapparatur erst mit Argon und dann mit Wasserstoff gespült. Danach wird die Reaktionsmischung 15 h unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird unter Verwendung von Celite als Filterhilfsmittel abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels werden 9,5 mmol des hell gelben Produktes erhalten. (Ausbeute 85%) .

5-(Methacryllamino)-*m*-xylolbisphosphonsäuretetramethylester

In der dritten Stufe werden 5-Amino-*m*-xylol-bisphosphonsäuretetramethylester (9,5 mmol), Triethylamin (11,2 mmol) und eine katalytische Menge 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin in 100 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Eine Lösung, aus Methacrylsäurechlorid (14,1 mmol) in 28 ml Dichlormethan wird in einem Zeitraum von 1 h hinzuge tropft. In Anschluss daran wird die Reaktionslösung noch 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird dann dreimal mit 30 ml 0,6 M NaOH gewaschen. Dieser Waschschrift ist zum Entfernen des überschüssigen Methacrylsäurechlorids und des während der Reaktion gebildeten Triethylammoniumchlorids. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Als feste Phase wird Silica-Gel verwendet und als Laufmittel wird Dichlormethan/Methanol (19/1 v/v, R_f = 0,09) verwendet. Da die Menge an Rohprodukt recht groß ist, sollten eine große oder zwei kleinere Chromatographiesäulen verwendet werden. Als Produkt wird ein hochviskoses Öl erhalten (7,9 mmol, Ausbeute 83%). In dieser Stufe wird die Reinheit des Produktes mit ¹H-NMR bestimmt. Die Literaturwerte wurden mit dem Programm „Chem Draw Ultra 8“ von Cambridge Soft Life Science Solution simuliert. ¹H-NMR Vorhersage in CDCl₃; δ(ppm) = 1,93 (s, 3H); 3,15 (d, 4H); 3,70 (d, 12H); 5,49 (q, 1H); 5,89 (q, 1H); 6,60 (m, 1H); 7,92 (m, 1H); 8,0 (s, 1H).

5-(Methacryllamino)-*m*-xylolbislithiumphosphatedimethylester

In der vierten Stufe wird 5-(Methacryllamino)-*m*-xylolbisphosphonsäuretetramethylester hydrolysiert. Dazu werden 5-(Methacryllamino)-*m*-xylol-bisphosphonsäuretetramethylester (7,9 mmol) und Lithiumbromid (15,8 mmol) in 150 ml Acetonitril gelöst.^[49] Die Reaktionsmischung wird bei Rückflussbedingungen einen Tag gerührt. Durch die Rückflussbedingungen wird das entstehende Brommethan direkt aus der Reaktionslösung entfernt. Nach der Reaktion wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Produkt ist ein gelber Feststoff (7,8 mmol, 99% Ausbeute). Die Reinheit des Produktes wird auch hierbei mittels ¹H-NMR bestimmt. Die Literaturwerte wurden auch hierbei mit dem Programm „Chem Draw Ultra 8“ von Cambridge Soft Life Science Solution simuliert. ¹H-NMR Vorhersage in CDCl₃; δ(ppm) = 1,93 (s, 3H); 3,15 (d, 4H); 3,70 (d, 12H); 5,49 (q, 1H); 5,89 (q, 1H); 6,60 (m, 1H); 7,92 (m, 1H); 8,0 (s, 1H).

4.1.2 Synthese von 6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid-β-cyclodextrin

Bei der Synthese von 6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid-β-cyclodextrin handelt es sich um eine 3 Stufen Synthese. Die letzten 2 Stufen sind in der Literatur ^[49,115] beschrieben. Die Durchführung dieser Reaktion wird in dieser Arbeit ins Deutsche übersetzt und Änderungen im Syntheseverlauf werden beschrieben.

6'-o-(p-Tolylsulfonyl)-β-cyclodextrin

Die erste Stufe ist die Herstellung von 6'-o-(p-Tolylsulfonyl)-β-cyclodextrin. Dazu werden für die Reaktion β-Cyclodextrin (44.1 mmol) in 1,5 L 0,4 M NaOH gelöst. Zu der Lösung wird para-Toluolsulfonsäurechlorid (262 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wird 3 h bei 0°C gerührt. Nach der Reaktion wird nicht umgesetztes para-Toluolsulfonsäurechlorid abfiltriert und die erhaltene Lösung wird mit 1M Salzsäure neutralisiert. Dabei fällt das Produkt aus. Das Produkt wird abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Das gereinigte Produkt (9,6 mmol, Ausbeute 22%) wird im Vakuum getrocknet.

6'-Deoxy-6'-N-(2-Aminoethylimino)-β-cyclodextrin

In der zweiten Stufe wird eine aminolyse Reaktion durchgeführt. Dazu werden 6'-O-(p-Tolylsulfonyl)-β-cyclodextrin (1,56 mmol) in 10 ml Ethylendiamin gelöst und unter Argon Atmosphäre 15 h bei 70°C gerührt. In Anschluss wird das überschüssige Ethylendiamin mittels Vakuum entfernt. Wenn das Reaktionsgemisch trocken ist, werden 50 ml Ethanol zugegeben, und es wird nochmal 30 min unter Rückflussbedingungen gerührt. Das Rohprodukt wird abgesaugt und in ca. 100 ml Wasser aufgenommen. Anschließend wird diese Lösung fünfmal mit je 100 ml Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wird im Vakuum getrocknet und im Anschluss nochmal in 3 ml Wasser gelöst. Das Produkt wird mit Hilfe von 30 ml Ethanol ausgefällt. Nach Absaugen wird das Produkt (1,39 mmol, Ausbeute 89%), als weißer Feststoff erhalten.

6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid-β-cyclodextrin

In der dritten Stufe wird 6'-Deoxy-6'-N-(2-Aminoethylimino)-β-cyclodextrin (1,39 mmol) in 80 ml DMF gelöst und auf 0°C temperiert. Methacrylsäurechlorid (3,1 mmol) wird in 15 ml DMF gelöst und zu der Reaktionslösung zugetropft. In Anschluss daran wird die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Danach wird das DMF im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wird in 1,5 ml Wasser aufgelöst und das Produkt wird mit 15 ml Ethanol ausgefällt. Danach wurde das Produkt (1,25 mmol, Ausbeute 90%) abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wird mit ¹H-NMR charakterisiert. ¹H-NMR durchgeführt bei 300 MHz in D₂O: δ (ppm) = 1,95 (s, 3H), 2,75-3,0 (m, 6H), 3,49-3,67 (m, 14H), 3,74-4,0 (m, 28H), 5,05 (s, 7H), 5,51 (s, 1H), 5,76 (s, 1H).

4.1.3 Synthese von *N*-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat

Bei der Synthese von *N*-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat handelt es sich um eine 3 Stufen Synthese, die in der Literatur ^[116] beschrieben ist. Die Durchführung dieser Reaktion wird in dieser Arbeit ins Deutsche übersetzt und Änderungen im Syntheseverlauf werden beschrieben.

N-Benzyloxycarbonyl-*N*-bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)-L-Lysinmethylester

In der ersten Stufe wird *N*-Benzyloxycarbonyl-L-Lysinmethylester (3.4 mmol) in 25 ml Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung werden Ethylbromacetat (34 mmol) und fein gemahlene K_2CO_3 (68 mmol) hinzugegeben. In Anschluss wird die Reaktionslösung bei Rückflussbedingungen 18 h gerührt. Das K_2CO_3 wird unter Verwendung von Celite als Filterhilfsmittel abfiltriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Als feste Phase wird Sillka-Gel verwendet und als Laufmittel wird Hexan/EtOAc (2/1 v/v). Das Produkt (2,8 mmol, Ausbeute 82%) wird nach der Chromatographie als farbloses Öl erhalten.

N-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*-bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)-L-Lysinmethylester

In der zweiten Stufe wird zu einer Lösung aus *N*-Benzyloxycarbonyl-*N*-bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)-L-Lysinmethylester (2,8 mmol) in 50 ml Ethanol, Palladium Katalysator auf Aktivkohle (0,15 g, 10 % Pd = 15 mg, 0,15 mmol) zugegeben. Im Anschluss daran wird die Reaktionsapparatur erst mit Argon und dann mit Wasserstoff gespült. Danach wird die Reaktionsmischung 2 h unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird unter Verwendung von Celite als Filterhilfsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Zwischenprodukt wird in 75 ml THF gelöst. Zu dieser Lösung wird Triethylamin (5,6 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C abgekühlt und eine Lösung aus Methacrylsäurechlorid (2,8 mmol) in 15 ml THF wird zugetropft. Die Reaktionslösung wird nun 30 min bei 0°C und im Anschluss 8 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Als feste Phase wird Sillka-Gel verwendet und als Laufmittel Hexan/EtOAc (1/1 v/v). Das Produkt (1,3 mmol, Ausbeute 46%) wird nach der Chromatographie als farbloses Öl erhalten. Die Charakterisierung erfolgt mittels 1H -NMR. Literaturwerte für die 1H -NMR Analyse, durchgeführt bei 300 MHz in $CDCl_3$: δ (ppm) = 1,23 (t, 6H), 1,40-1,60 (m, 4H) 1,68 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 3,27 (m, 2H), 3,4 (t, 1H), 3,57 (d, 2H), 3,61 (d, 2H), 3,65 (s, 3H), 5,10 (q, 4H), 5,27 (s, 1H), 5,67 (s, 1H) 6,14 (bs, 1H)

***N*-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat**

In der dritten Stufe wird *N*-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*-bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)-L-lysinmethylester (1,3 mmol) in 20 ml Wasser / Aceton (1 / 4 v / v) gelöst. Zu der Lösung werden LiOH (3,9 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird für 12 h bei RT gerührt. Nach der Reaktion wird Aceton im Vakuum entfernt und die erhaltene wässrige Lösung wird gefriergetrocknet. Danach wird ein weißer Feststoff erhalten. (1,3 mmol, Ausbeute 100%). Die Charakterisierung des Produkts erfolgt mittels ¹H-NMR. Literaturwerte für die ¹H-NMR Analyse, durchgeführt bei 300 MHz in D₂O: δ (ppm) = 1,20-1,33 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,79 (s, 3H), 2,89 (dd, 1H), 2,95 (d, 2H), 3,03 (d, 2H), 3,13 (ddd, 2H), 5,29 (s, 1H), 5,52 (s, 1H)

4.1.4 Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure

Benzoinethylether (0,083 mol) wird in 40 ml DMSO, welches 1,6 ml 4M KOH-Lösung als Katalysator enthält, gelöst. Die Reaktion erfolgt 4 h mit Ethylacrylat (0,092 mol). Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Produkt wird 24 h bei RT in 100 ml 1M NaOH-Lösung, welche 6% Methanol beinhaltet, hydrolysiert. Im Anschluss daran wird das Lösungsmittel wieder im Vakuum entfernt. Zum Entfernen des Hydroxids wird das verbleibende Produkt in Dichlormethan gelöst. Nach entfernen des Dichlormethans wird das Produkt (Ausbeute ca. 83%) erhalten. Das Produkt wird mittels ¹H-NMR und Elementaranalyse analysiert.^[117] Die Literaturwerte wurden auch hierbei mit dem Programm „Chem Draw Ultra 8“ von Cambridge Soft Life Science Solution simuliert. ¹H-NMR Vorhersage in CDCl₃; δ(ppm) = 1,11 (t, 3H); 2,17-2,23 (m, 4H); 3,41 (m, 2H); 7,19 (s, 4H); 7,34 (t, 2H); 7,44 (m, 1H); 7,89 (t, 2H)

4.1.5 Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid

Um das Bromderivat aus 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure zu erhalten, wird eine Hell-Volhard-Zelinsky Reaktion durchgeführt.^[118] Dazu werden in einer Argon Atmosphäre 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure (6,4 mmol) in 40 ml trockenem THF gelöst. Zu der Lösung werden ca. 4 mg roter Phosphor als Katalysator zugegeben. Das Brom (6,4 mmol) wird nun in 10 ml trockenem THF gelöst und langsam zur 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure Lösung zugetropft. Danach wird die Reaktionsmischung 5 h unter Rückflussbedingungen gerührt. Im Anschluss wird das THF im Vakuum entfernt und das Produkt (Ausbeute 95%) wird mittels IR-Spektroskopie, ¹H-NMR und Elementaranalyse analysiert. Dies geschieht, um das Produkt zu identifizieren und die Reinheit zu testen. Die Literaturwerte wurden wieder mit dem Programm „Chem Draw Ultra 8“ von Cambridge Soft Life Science Solution simuliert. ¹H-NMR Vorhersage in CDCl₃; δ(ppm) = 1,11 (t, 3H); 2,17-2,23 (m, 4H); 3,41 (m, 2H); 7,19 (s, 4H); 7,34 (t, 2H); 7,44 (m, 1H); 7,89 (t, 2H)

4.2 Photoinitiator Immobilisierung

4.2.1 Kovalent immobilisierter „Typ I“-Photoinitiator

Bei der kovalenten Immobilisierung des „Typ I“-Photoinitiators wurden drei Methoden verwendet. Eine Methode wurde dazu genutzt, den Photoinitiator auf PET-Membranen zu immobilisieren und zwei dazu, um ihn auf Cellulose-Membranen zu immobilisieren (Abbildung 4.1). Die PET-Membranen wurden dazu mit einer etablierten Methode^[119] mit Aminogruppen funktionalisiert, um eine Peptid-Kupplung möglich zu machen. Die erste Route für die Cellulose-Membranen war eine Reaktion mit Epichlorhydrin^[120], gefolgt von der Einführung von Aminogruppen und der anschließenden Initiatorimmobilisierung via Peptid-Kupplung. Die zweite Route war eine direkte Reaktion von Cellulose mit dem bromierten Derivat des Photoinitiators.

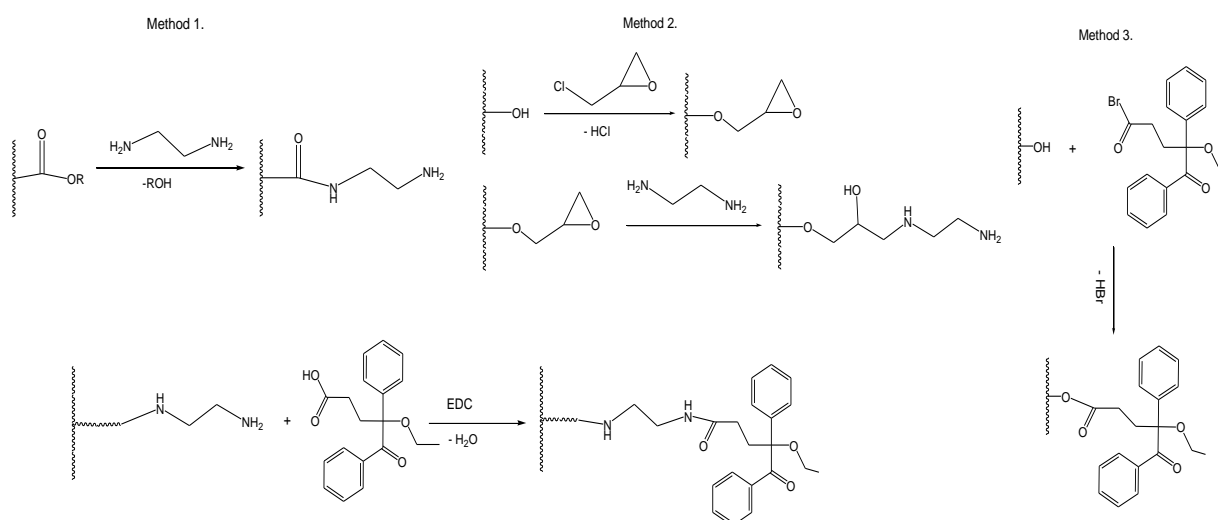


Abbildung 4.1 Reaktionsschema der Photoinitiator Immobilisierung

Method 1:

Im ersten Schritt erfolgt die Einführung von Aminogruppen. Dazu werden 3 ml Ethylendiamin zu einer runden PET-Membran (\varnothing 47 mm) hinzugegeben. Die Reaktion wird 1 h, auf einem Schüttler mit einer Geschwindigkeit von 100 rpm durchgeführt. Die Immobilisierung des Initiators erfolgt dann im zweiten Schritt via Peptid-Kupplung. Dabei werden 50 mg Photoinitiator (SS6) und 5 mg EDC in 3 ml Wasser aufgelöst und die aminolysierte Membran wird hinzugefügt. Die Reaktion wird 2 h auf einem Schüttler bei 100 rpm durchgeführt. Nach jedem Reaktionsschritt werden die Membranen mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml Wasser und noch einmal mit 20 ml Ethanol für mindestens 30 min gewaschen. Anschließend werden die Membranen bei 50°C mindestens 1 h getrocknet.

Methode 2:

Eine Cellulose-Membran (\varnothing 47 mm) wird in eine Lösung aus 10 ml 0,1 M NaOH mit 5 ml EPI gegeben und bei 45°C 2h inkubiert. Danach wird die Membran mit Wasser gewaschen. Die Einführung von Amin-Gruppen erfolgt dann in 20 ml, 1 M EDA Lösung, in welcher die Membran für 12 h bei 45°C inkubiert wird. Im Anschluss wird die Membran wieder mit Wasser gewaschen. Die Peptid-Kupplung wird auf demselben Weg durchgeführt wie bei der PET-Membrane (siehe Methode 1).

Methode 3:

Eine Cellulose-Membran (\varnothing 47 mm) wird in eine Lösung ausgegeben. Diese Lösung besteht aus 50 mg bromierten Photoinitiator (SSBr) und 50 mg Et₃N, welches in 3 ml trockenem THF gelöst ist. Die Reaktion wird in einem gasdichten Behälter für 4 h, bei einer Temperatur von 55°C auf einem Schüttler mit 300rpm durchgeführt. Nach der Reaktion werden die Membranen mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml Wasser und noch mal mit 20 ml Ethanol für jeweils 30 min gewaschen und anschließend getrocknet. Das Trocken erfolgt wieder in einem Trockenschrank bei 50°C für mindestens 1 h.

Zum Variieren der Photoinitiatordichte werden dieselben Reaktionsprotokolle verwendet. Allerdings wird bei den Methoden 1 und 2 Benzoesäure und bei der Methode 3 Benzoesäurebromid zugegeben. Das Verhältnis zwischen Photoinitiator und Benzoesäure bzw. Benzoesäurebromid wird variiert, um so unterschiedliche Photoinitiatordichten zu erhalten.

4.2.2 “Synergist Immobilisierung”**PET:**

Zur Einführung von ternären Aminogruppen werden 3 ml DEEDA zu einer runden PET-Membran (\varnothing 47 mm) gegeben. Die Reaktion wird 1 h auf einem Schüttler bei 100 rpm durchgeführt. Nach der Reaktion wird die Membran mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml Wasser und noch einmal mit 20 ml Ethanol für mindestens 30 min gewaschen und anschließend getrocknet.

Cellulose:

Eine Cellulose-Membran (\varnothing 47 mm) wird in eine Lösung aus 10 ml 0,1 M NaOH und 5 ml EPI gegeben und bei 45°C 2 h inkubiert. Danach wird die Membran mit Wasser gewaschen. Die Einführung der Amin-Gruppen erfolgt dann in 20 ml 1 M DEEDA Lösung, bei 45°C, für 12 h. Im Anschluss wird die Membran wieder mit Wasser gewaschen und getrocknet.

4.3 „Grafting from“

Kovalent Immobilisierter „Typ I“-Photoinitiator

Eine vorfunktionalisierte Membran (Abschnitt 4.2) wird in einer Petrischale platziert, dann wird 1 ml Monomerlösung hinzugefügt und die Membran wird mit einer etwas kleineren Petrischale abgedeckt (Abb. 4.2). Die verwendete Monomerkonzentration beträgt, sofern nicht anders angegeben, 100 g/L. Die Monomere werden in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (1/1, v/v) gelöst. Nach maximal 10 min Equilibrierung wird die UV Bestrahlung in einem UV Cube 2000 von Hoenle für 30 min bei einer Intensität von 20 mW/cm² (gemessen mit einem UVA Meter von Hoenle) durchgeführt. Nach der Reaktion werden die Membranen mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml Wasser und noch mal mit 20 ml Ethanol für mindestens 30 min gewaschen und anschließend bei 50°C für mindestens 1 h getrocknet.

„Synergist Immobilisierung“

Für die Polymerisationen via „Synergist Immobilisierung“ werden dieselben Reaktionsbedingungen verwendet wie bereits oben beschrieben. Allerdings werden die Membranen hierbei auf einen Fiberglasabstandhalter gelegt, um den Transport des Photoinitiators zur Membranoberfläche zu verbessern. Als Photoinitiator wird Benzophenon (1,2 mol/L) hinzugefügt.

Zum Vergleich, wurden für jedes Protokoll mindesten drei Membranen mit einem Durchmesser von 47 mm modifiziert. Zusätzlich werden als Kontrolle für jedes Protokoll, drei Membranen ohne die Zugabe von Photoinitiator „modifiziert“.

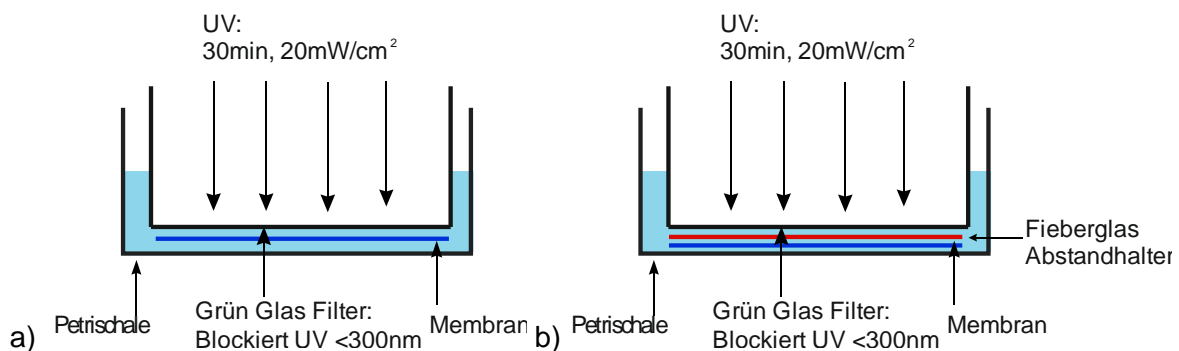


Abbildung 4.2 Aufbau der Reaktionsapparatur in der UV-Box a) für Kovalent Immobilisierten „Typ I“-Photoinitiator b) für „Synergist Immobilisierung“.

4.3.1 Pfropfen in einer 96er Titerplatte

Zum Pfropfen in einer 96er Titerplatte wird Photoinitiator auf Cellulose-Membranen (\varnothing 47 mm) nach Methode 2 oder Methode 3 immobilisiert. Im Anschluss daran werden aus den 47 mm Membranen, mit einem Lochseisen, so viele 5 mm Membranen wie möglich ausgestanzt. Pro 47 mm Membran werden ca. 25 kleine 5 mm Membranen erhalten. Jede dieser 5 mm Membranen wird in eine eigene Kavität der 96er Titerplatte platziert. Dann werden in jede Kavität mit Membran 50 μ L Monomer-Lösung hinzugefügt. Auch hierbei beträgt die verwendete Monomerkonzentration 100 g/L, sofern nicht anders angegeben. Die Monomere werden in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (1/1, v/v) gelöst. Als Nächstes wird die Titerplatte mit einem Grünglasfilter abgedeckt und nach maximal 10 min Equilibrierung wird die UV Bestrahlung in einem UV Cube 2000 von Hoenle für 30 min bei einer Intensität von 20 mW/cm² durchgeführt. Im Anschluss an die Bestrahlung werden die Membranen in der Titerplatte gewaschen. Dazu wird zuerst die restliche Reaktionslösung mit einer Pipette aus den Kavitäten entfernt. Dann werden die Membranen mit 300 μ L Ethanol, 300 μ L Wasser und wieder 300 μ L Ethanol für jeweils 30 min auf einem Schüttler bei 300 rpm gewaschen. Im Anschluss an jeden Waschschrift wird die Waschlösung mit einer Pipette entfernt. Nach dem Waschvorgang werden die Membranen bei 50°C getrocknet.

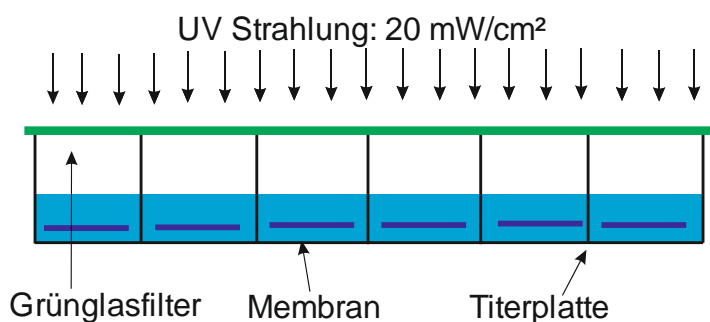


Abbildung 4.3 Schematischer Aufbau der Reaktionsapparatur in der UV-Box für das Pfropfen in einer 96er Titerplatte. Nur 6 Kavitäten sind dargestellt.

4.3.2 Herstellung von „Kamm ähnlichen“-Strukturen

Die Herstellung von „Kamm ähnlichen“-Strukturen erfolgt in mehreren Schritten (siehe Abbildung 4.4). Hierzu wird auf 47 mm Membranen nach Methode 1, 2 oder 3 Photoinitiator immobilisiert. Zuerst wird dann ein „Rückgrat“-Polymer gepfropft. Zum Pfropfen dieses „Rückgrat“-Polymers wird je eine vorfunktionalisierte Membran in eine Petrischale gelegt, 1 ml Monomerlösung hinzugefügt und die Membran wird mit einer etwas kleineren Petrischale abgedeckt (siehe Abbildung 4.2). Die Monomer-Lösungen bestehen aus jeweils 100 g/L Monomer (HEMA, 2-Hydr, HEMA/DMApAA 1/1), welches in 1 ml Wasser gelöst wird. Nach maximal 10 min Equilibrierung, wird die UV Bestrahlung in einem UV Cube 2000 von Hoenle für 10 min bzw. 30 min bei einer Intensität von 20 mW/cm² durchgeführt. Nach der ersten

Bestrahlung werden die Membranen mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml Wasser und noch mal mit 20 ml Ethanol für je 30 min gewaschen und anschließend getrocknet. Auf dem gepfropften „Rückgrat“-Polymer wird dann Photoinitiator immobilisiert. Dazu wird eine Membran mit „Rückgrat“-Polymer in eine Lösung aus 50 mg bromierten Photoinitiator (SSBr) mit 50 mg Et₃N gelöst in 3 ml trockenem Acetonitril gegeben. Die Reaktion wird in einem gasdichten Behälter für 4 h bei einer Temperatur von 55°C auf einem Schüttler mit 300 rpm durchgeführt. In diesem Schritt wird Acetonitril verwendet, da die verwendeten „Rückgrat“-Polymere nur schlecht in THF quellen. Im Anschluss an die zweite Photoinitiator-immobilisierung wird die Membran wieder wie oben beschrieben gewaschen und getrocknet. Das Aufbringen des Funktionalpolymers erfolgt wie in Abschnitt 4.3, kovalent immobilisierter „Typ I“-Photoinitiator, beschrieben.

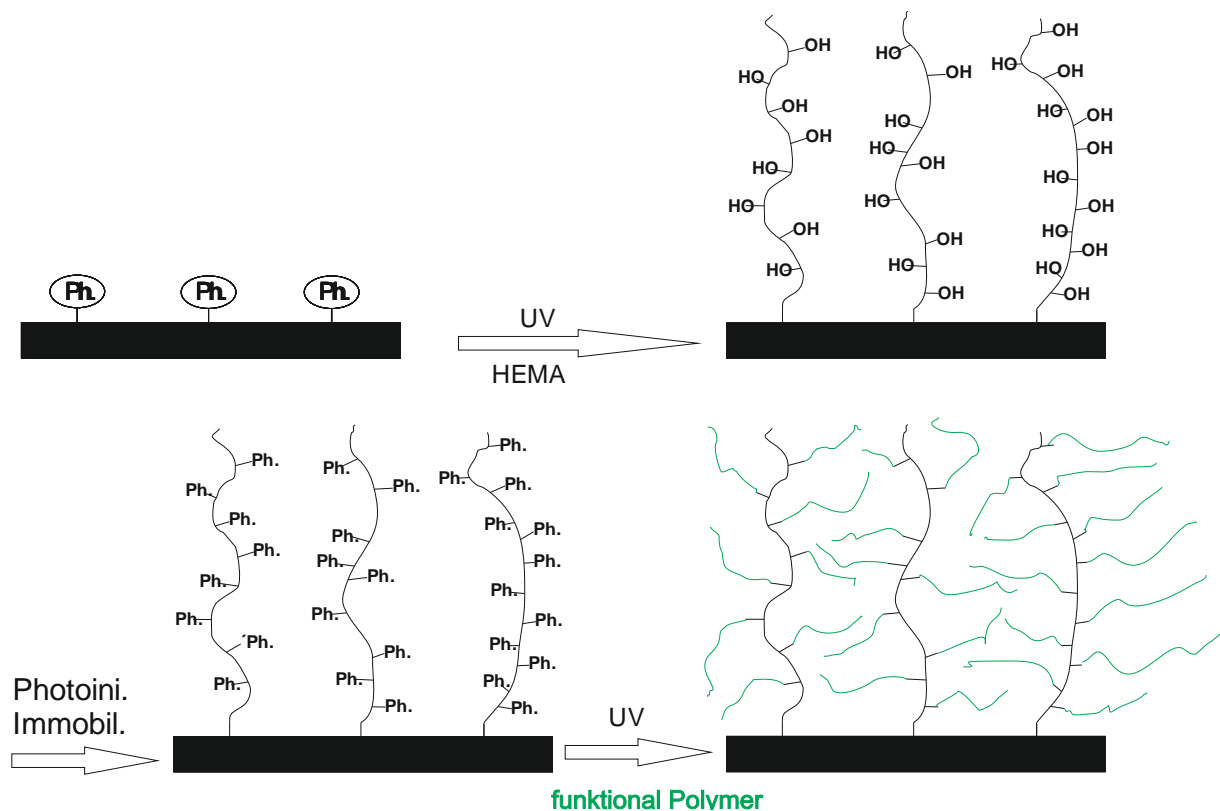


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung zur Herstellung von „Kamm ähnlichen“-Strukturen

4.3.3 Herstellung von molekular geprägten Polymeren

Die Herstellung von molekular geprägten Polymeren erfolgt wiederum in mehreren Schritten (siehe Abbildung 4.5).

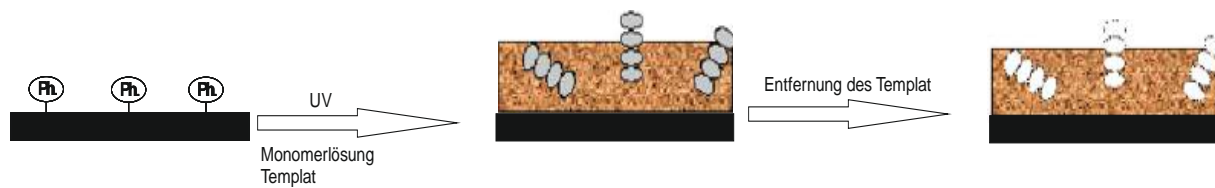


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung zur Herstellung von Molekular geprägten Polymeren.

Auch hierbei wird wieder eine 47 mm Membran, die nach Methode 1, 2 oder 3 vorfunktionalisiert wird, als Grundlage verwendet. Das Pfropfen der Polymere wird wieder in einer Petrischale, mit 1 ml Monomerlösung und einer etwas kleineren Petrischale als Deckel durchgeführt (Abb. 4.2). Die Monomermischung besteht aus 10 mM Methacrylsäure, 100 mM Ethylenglykoldiacrylat und 100 mM Methacrylamid. Die Monomere werden in 1 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden dann entweder 2 mg IgG oder 2 mg des Epitop-Peptids T10 als Templat hinzugegeben.^[121] Das Peptid und die Zusammensetzung der Monomerlösung ist durch die Arbeitsgruppe von Dr. Börje Sellergren zur Verfügung gestellt worden.

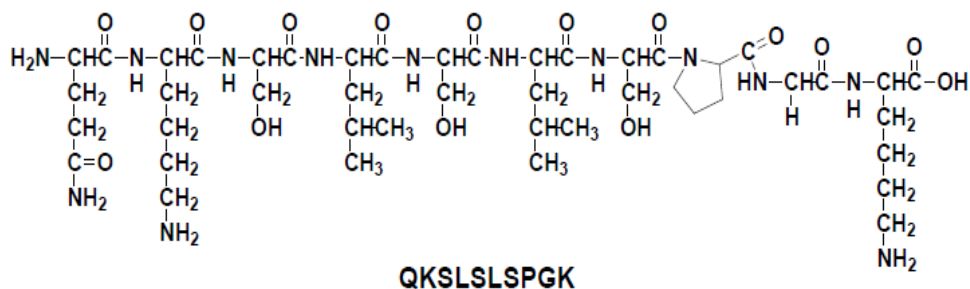


Abbildung 4.6 Zusammensetzung des Epitop-Peptids T10^[121]

Die UV-Bestrahlung wird hierbei nach maximal 10 min Equilibrierung, in einem UV Cube 2000 von Hoenle für 10 min bzw. 30 min bei einer Intensität von 20 mW/cm² durchgeführt. Nach der Bestrahlung werden die Membranen mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml 1 M Natriumchloridlösung, mit 20 ml Wasser und noch mal mit 20 ml Ethanol für jeweils 30 min gewaschen und anschließend getrocknet. Der zusätzliche Waschschrift mit Natriumchloridlösung stellt sicher, dass das Templat nach dem Waschen entfernt ist.

4.4 Membran Charakterisierung

Die Charakterisierungen der Membranen werden dazu verwendet, Unterschiede zwischen den Basismembranen und den modifizierten Membranen sichtbar zu machen und den Erfolg der Modifizierungen zu klassifizieren. Dabei werden unterschiedlichste physikalische und chemische Charakterisierungsmethoden verwendet. In diesem Abschnitt werden die verwendeten Charakterisierungsmethoden beschrieben.

4.4.1 Pfropfungsgrad

Der Pfropfungsgrad (DG) gibt die Gewichtsänderung einer Membran durch eine Pfropf-Polymerisation an. Die Bestimmung des DG-Werts erfolgt gravimetrisch. Dazu wird das Gewicht einer Membran vor und nach einer Pfropf-Polymerisation bestimmt. Die Berechnung des Pfropfungsgrads kann auf zwei Arten erfolgen. Zum einen kann die prozentuale Gewichtsänderung angegeben werden, dann wird die Gleichung (1) zur Berechnung verwendet.^[122] Dazu wird dann die Masse der Membran vor (m_0) und nach (m_1) der Reaktion verwendet.

$$DG = \frac{m_1 - m_0}{m_0} 100\% \quad (1)$$

Häufiger wird aber die zweite Variante verwendet. Diese bezieht sich auf die spezifische Oberfläche der Membran. Die Gewichtsänderung ($m_1 - m_0$) wird hierbei durch die gesamte Oberfläche der Membran geteilt und in mg/cm^2 oder $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ angegeben. Die gesamte Oberfläche der Membranen wird über die spezifische Oberfläche einer Membran im Bezug auf das Gewicht bestimmt. Die dazu benötigte spezifische Oberfläche der Membran (m^2/g) wird entweder vom Hersteller angegeben oder mittels BET-Messung (Abschnitt 4.4.5) experimentell bestimmt. Die Berechnung dieses DGs ist in Formel (2) dargestellt.^[123]

$$DG = \frac{m_1 - m_0}{\text{gesamte Membranoberfläche } [\text{cm}^2]} \quad (2)$$

4.4.2 Permeabilität

Die Permeabilität gibt an, wie gut eine Membran für ein Gas oder eine Flüssigkeit durchlässig ist. Die treibende Kraft der Permeabilität bei einer porösen Membran ist ein Druckgradient. Um die Permeabilität berechnen zu können, wird eine speziell auf Membranen abgestimmte Form der Hagen-Poiseuille-Gleichung (3) verwendet. Diese Hagen-Poiseuille-Gleichung gibt den Zusammenhang zwischen Druckdifferenz und Durchfluss an.^[124]

$$J = \frac{V}{\Delta t A} = \frac{\varepsilon \Delta P r_p^2}{8 \eta L \tau} \quad (3)$$

Die Hagen-Poiseuille-Gleichung kann dann durch Umstellen so abgeleitet werden, dass sie bis auf die Viskosität nur noch von der Membran abhängige Parameter enthält. Für die Permeabilität gilt dann folgende Formel (4).^[124,125]

$$\frac{J}{\Delta P} = \frac{\varepsilon r_p^2}{8 \eta L} \quad (4)$$

Mit Hilfe dieser Formel können bei bekannter Permeabilität und bei Membranen mit zylindrischer Porenstruktur z.B. PET-Kernspurmembranen, sämtliche Membran-Parameter berechnet werden.

Die Permeabilität der Kernspurmembranen (\varnothing 47 mm) wird mit einer Amicon Stirred Ultrafiltration Cell, Modell 8050 von der Millipore Corporation bestimmt. Die Messungen werden mit Wasser bei RT durchgeführt. Der verwendete Druck beträgt 0,3 bar bei einer Durchlaufzeit von 1 min.

Auch die Permeabilitätsmessungen der Cellulose-Membranen (\varnothing 47 mm) werden mit einer Amicon Stirred Ultrafiltration Cell, Modell 8050 von der Millipore Corporation bestimmt. Die Messungen werden auch hierbei mit Wasser bei RT durchgeführt. Allerdings wird für diese Membranen nur ein Druck von 0,1 bar bei einer Durchlaufzeit von 30 s verwendet.

4.4.3 Kontaktwinkel Messungen

Die Messung des Kontaktwinkels wird als einfache Methode zur Bestimmung der Hydrophilie von Oberflächen verwendet. Weiter können bei bekanntem Kontaktwinkel die zugehörigen Grenzflächenenergien nach Young berechnet werden (Formel 5).^[1243]

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos \theta \quad (5)$$

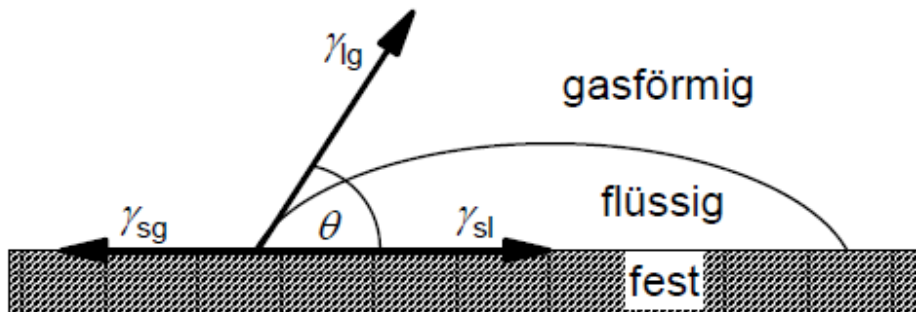


Abbildung 4.7 Schematische Darstellung einer „Sessile-Drop“ Messung, mit Auswertung nach Young ^[124]

Der Kontaktwinkel θ ist als niedrigste Oberflächenenergie definiert. Mittels Kontaktwinkel kann daher auch eine Aussage über die Benetzbarkeit einer Membranoberfläche getroffen werden. Wenn bei der Messung des Kontaktwinkels Wasser verwendet wird, kann generell gesagt werden, bei $\theta < 90^\circ$ handelt es sich um hydrophile Oberfläche und bei $\theta > 90^\circ$ um hydrophobe Oberfläche. Zur Bestimmung des Kontaktwinkels werden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen die „Captive-Bubble“- Methode, dabei liegt das Substrat auf der Flüssigkeit auf und es wird eine Gasblase von unten an die Membran gebracht.^[55] Die andere Methode ist die „Sessile-Drop“-Methode. Hierbei wird einfach ein Tropfen der Messflüssigkeit auf die Oberfläche aufgebracht.^[55] Bei beiden Methoden wird der Kontaktwinkel durch die Basislinie und eine Tangente am Dreiphasenpunkt bestimmt (siehe Abbildung 4.7). Der Kontaktwinkel ist der Winkel, der zwischen Tangente und Basislinie entsteht. ^[124]

Die Kontaktwinkel-Messungen der Membranen werden mit einem Contact Angle System OCA 15 Puls von Dataphysics durchgeführt. Als Methode wird die Sessile-Drop“- Methode verwendet. Die Tropfengröße beträgt $5 \mu\text{l}$ und es werden fünf Messungen für jede Membran durchgeführt. Der Kontaktwinkel wurde immer 10 s nach Aufbringen des Tropfens gemessen. In Anschluss daran wurde ein Mittelwert aus den fünf Messungen berechnet.

4.4.4 Permporometrie Messungen

Die Permporometrie ist eine Methode zur Bestimmung der Porendurchmesser und der Porengrößenverteilung bei Membranen. Dabei kann eine Porengrößenverteilung von 10 nm bis 500 µm abgedeckt werden. Das Prinzip dieses Verfahren beruht darauf, alle Poren einer Membran mit einer Flüssigkeit zu benetzen und im Anschluss eine Verdrängung mit einem inerten Gas herbeizuführen. Die Flüssigkeit muss dazu eine möglichst geringe und bekannte Fest/Flüssig-Grenzflächenenergie aufweisen. Außerdem muss die Flüssigkeit so gewählt werden, dass die Membran nicht verändert wird. Die benötigte Energie für die Verdrängung der Flüssigkeit wird durch den angelegten Druck hinzugegeben.^[55] Der Zusammenhang zwischen Porendurchmesser und Druck kann dann mit Hilfe der Young-Laplace-Gleichung beschrieben werden.^[126, 127] Die benötigte Form der Young-Laplace-Gleichung ist in Formel (6) aufgetragen.

$$d = \frac{4 \gamma \cos \theta}{p} \quad (6)$$

Durch Umstellen dieser Formel kann die mittlere Porengröße bestimmt werden. Die mittlere Porengröße wird dann nach Formel (7) berechnet.

$$d_m = \frac{4 \gamma_{lg} p_0}{p_{mf} \theta} \quad (7)$$

Mit Hilfe der mittleren Porengrößen kann dann nach Formel (8) die prozentuale Anzahl an Poren bei den verschiedenen ermittelten Porengrößen berechnet werden.

$$f_F = \frac{-\Delta[(F_w/F_D)100\%]}{\Delta d_m} \quad (8)$$

Aus den so ermittelten Werten für die Anzahl aller verschiedenen Poren kann dann die Porengrößenverteilung aufgetragen werden.^[55,124]

Die Porengrößen-Verteilung wird mit Hilfe eines Capillary Flow Porometer, CFP-34RTG8A-X-6-L4 von der Porous Materials Inc. gemessen. Als Methode wurde die Dry-up/Wet-up Methode verwendet. Diese Methode wird sowohl für die PET-Membranen als auch für die Cellulose-Membranen verwendet. Allerdings wird bei den Cellulose-Membranen mit einem maximal Druck von 1 bar und bei den PET-Kernspurmembranen mit einem maximal Druck von 2,5 bar gearbeitet.

Bei der Dry-up/Wet-up Methode wird ein Gasfluss durch die Membran gegen den angelegten Druck aufgenommen. Dabei wird erst eine Kurve aufgenommen, bei der das inerte Gas durch die trockene Membran geleitet wird. Erst im Anschluss daran wird die Membran mit einer Flüssigkeit (hier Galwick) benetzt und eine Kurve für die benetzte Membran aufgenommen. Zur Berechnung der mittleren Porengrößen wird aus der Trockenkurve noch eine Halb-Trocken-Kurve berechnet. Dazu werden die Werte der Datenpunkte von der Trockenkurve halbiert. Dies ist nötig um den, für Formel (7) benötigten „mean flow pressure“

zu erhalten. Der „mean flow pressure“ ist der Druck, der herrscht, wenn die Kurve der benetzten Membran von der Halb-Trocken-Kurve geschnitten wird. Ein Beispiel Diagramm für eine komplette Permporometriemessung ist in Abbildung 4.8 aufgetragen.

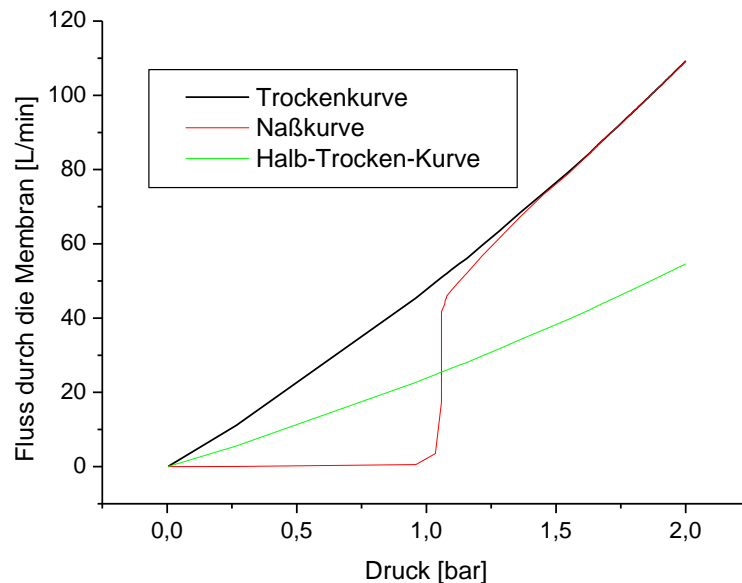


Abbildung 4.8 Diagramm einer Permporometrie Messung mit berechneter Halb-Trocken-Kurve.

4.4.5 BET Messungen

Das BET-Verfahren ist ein Verfahren zur Bestimmung der Oberfläche von porösen Materialien. Es ist nach seinen Entwicklern Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett und Edward Teller benannt.^[128] Beim BET Verfahren handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die spezifische Oberfläche eines Materials mit Hilfe von Adsorptionsisothermen berechnet wird. Diese Adsorptionsisothermen können dabei sowohl volumetrisch als auch gravimetrisch bestimmt werden.^[129] Die verwendete Methode ist die volumetrische Bestimmung, bei der die Adsorptionsisothermen bei kryogenen Temperaturen (flüssiger Stickstoff, -196°C) aufgenommen werden. Die Adsorptionsisothermen werden bei diesen geringen Temperaturen aufgenommen um attraktive Wechselwirkungen zwischen dem Gas und dem Material zu verringern und es dadurch näher an ein ideales Gas zu bringen. Dadurch wird die Genauigkeit der Messung erhöht.^[129,130] Die Berechnung der spezifischen Oberfläche erfolgt dann mit Hilfe der BET-Gleichung. Die Formel (9) lautet:^[131]

$$\frac{p}{V(p_0 - p)} = \left(\frac{1}{V_m C} \right) + \left[\frac{C - 1}{V_m C p_0} p \right] \quad (9)$$

Dabei ist V das Volumen, das bei einem bestimmten Druck p adsorbiert wird. V_m ist das Volumen, das für eine Monoschicht benötigt wird und p_0 ist der Gasdruck, der benötigt wird,

um eine Sättigung bei der Versuchstemperatur zu erreichen.^[131] Die gesamte Ableitung der BET-Gleichung kann in den Literaturstellen^[130, 131] nachgelesen werden.

Die BET Messungen werden in einem SA3100 Surface Area Analyser von der Beckman Coulter GmbH durchgeführt.

4.5 Charakterisierung des immobilisierten Photoinitiators

Die hier verwendete Charakterisierung des immobilisierten Photoinitiators kann nur auf Cellulose-Membranen durchgeführt werden, da PET-Membranen durch diese Methode zerstört werden. Für die Charakterisierung wird der Photoinitiator nach Methode 3 auf der Membranoberfläche immobilisiert.

Entfernen des Photoinitiators von der Membranoberfläche

Das Entfernen des Photoinitiators von der Membranoberfläche wird als saure Esterspaltung durchgeführt. Dazu werden die nach Methode 3 vorfunktionalisierten Membranen in einem Polypropylenbehälter mit 3 ml 1 M Salzsäure versetzt. Die Membranen werden 3,5 h in der Salzsäure bei 100 rpm geschüttelt. Die Lösung aus Salzsäure und Photoinitiator wird in einem 10 ml Rundkolben aufgefangen und die Salzsäure wird im Vakuum entfernt. Der Photoinitiator bleibt im Rundkolben zurück.

Die Membranen werden im Anschluss mit 20 ml Ethanol, danach mit 20 ml Wasser und mit noch einmal 20 ml Ethanol für jeweils 30 min gewaschen und anschließend bei 50°C für mindestens 1 h getrocknet. Nach dem Trocknen können die Membranen wiederverwendet werden.

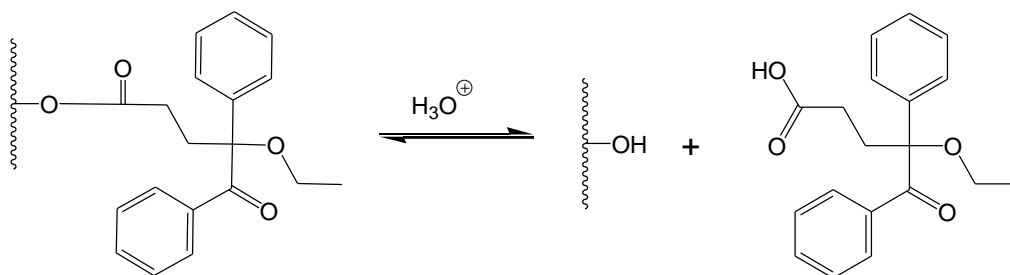


Abbildung 4.9 Schematische Darstellung einer sauren Esterspaltung

Charakterisierung des Photoinitiators via HPLC

Die Charakterisierung des Photoinitiators wird mittels HPLC durchgeführt. Das HPLC-System besteht aus einer P580 Pumpe von Dionex und einem Autoinjektor 235 von Gilson. Als Säule wird eine Cromasil C18 RP, 150 mm x 4 mm, 5 μ m Partikel Größe, verwendet. Der Elutions-Puffer ist eine Mischung aus Methanol (70%), Wasser (29.9%) und TFA (0.1%). Die Messung wird bei einer Temperatur von 40°C und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Detektion wird mit einem UV Detektor, bei einer Wellenlänge von 250 nm durchgeführt.

Der im Rundkolben getrocknete Photoinitiator wird in 300 µl Elutions-Puffer gelöst. Das Injektionsvolumen beträgt 20 µl pro Messung. Die Peaks von Photoinitiator und „Abstandhalter“ werden nach der Messung integriert. Über die ermittelte Fläche kann der jeweilige Anteil berechnet werden. Zur quantitativen Auswertung werden mit derselben HPLC-Methode Eichgraden für den Photoinitiator und die „Abstandhalter“ angefertigt. Aus diesen Eichgraden kann dann die Konzentration des Photoinitiators und „Abstandhalters“ berechnet werden.

4.6 Charakterisierung der Pfpf-Copolymere

Bei der Charakterisierung der Pfpf-Copolymere können auch wieder nur Cellulose-Membranen verwendet werden, da auch hierbei die PET-Membranen durch die Methode zerstört werden. Für die Charakterisierung wird der Photoinitiator nach Methode 3 auf der Membranoberfläche immobilisiert. Die Membranen werden im Anschluss, wie in Abschnitt 4.3 kovalent immobilisierter „Typ I“-Photoinitiator beschrieben, beschichtet.

Entfernung der Polymere von der Membranoberfläche

Um die Polymere analysieren zu können, müssen diese nach der Pfpf-Polymerisation wieder von der Membranoberfläche entfernt werden. Dies geschieht mittels Esterspaltung. Anders als bei der Charakterisierung des Photoinitiators wird das Polymer basisch von der Membranoberfläche abgespalten. Dazu werden die modifizierten Membranen für 3 h in 3 ml Ethylendiamin bei 100 rpm geschüttelt. Die Lösung aus Ethylendiamin und Polymer wird in einem 10 ml Rundkolben aufgefangen.

Die Membranen werden im Anschluss mit 20 ml Ethanol, dann mit 20 ml Wasser und noch einmal mit 20 ml Ethanol für jeweils mindestens 30 min gewaschen und anschließend getrocknet. Nach dem Trocknen können die Membranen wiederverwendet werden.

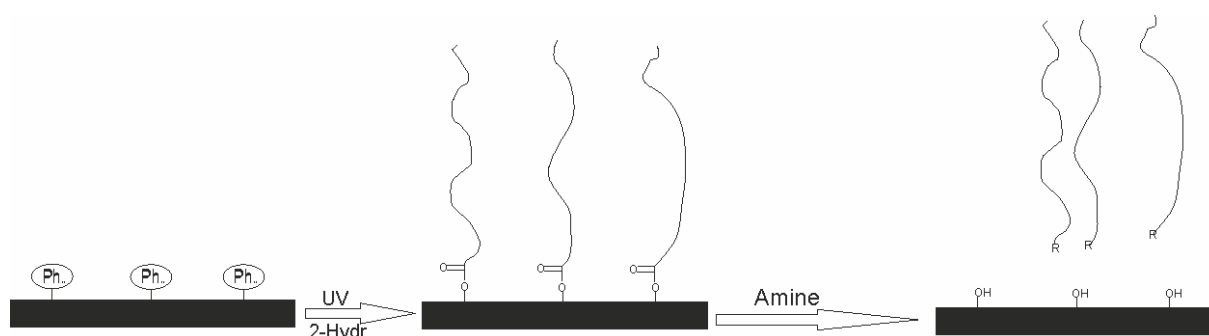


Abbildung 4.10 Schematische Darstellung der basischen Esterspaltung zum Abspalten der Polymere

Reinigung der Polymere

Nachdem die Lösung in den Rundkolben gefüllt wurde, wird das Ethylendiamin im Vakuum bei ca. 40°C entfernt. Das verbleibende Polymer wird in 5 ml Wasser für mindestens 1 h gelöst. Die entstandene Lösung wird dann durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Ausschlussgrenze von 1 kg/mol filtriert. Dadurch werden Saccharide mit einem geringen molekularen Gewicht entfernt. In Anschluss daran wird die Ultrafiltrationsmembran bei 50°C in einem Trockenschrank getrocknet. Danach werden die Polymere von der Membranoberfläche wieder gelöst. Für die GPC-Messungen werden die Polymere in 1 ml Dimethylformamid mit 0,01 mol/L LiBr gelöst. Das Lösen in DMF darf maximal 10 min dauern, da sonst auch die Ultrafiltrationsmembran gelöst wird. Wenn die Polymere mittels ^1H -NMR untersucht werden sollen, werden diese in 1 ml D_2O für 1 h gelöst.

Um die Nebenprodukte (Copolymere die in Lösung geformt werden) zu analysieren, wird die Monomerlösung, welche nach der Polymerisation in der Petrischale verbleibt, bei 50°C in einem Trockenschrank getrocknet. Die Mischung aus Monomer und Polymer wird in ein verschließbares Glasgefäß überführt und in 1 ml Dimethylformamid mit 0,01 mol/L LiBr gelöst. Diese Lösung wird mittels GPC analysiert.

Charakterisierung der Polymere via GPC

Das GPC System besteht aus folgenden Komponenten: Einer Waters 590 Pumpe, drei Säulen, eine MZ SDpluslin 10 μm , eine MZ SDplus-1000 10 μm und eine MZ SDplus-100 10 μm . Als Detektor kommt ein Shodex RI-71 Detektor zum Einsatz. Die Flussrate ist 1 ml/min und das Laufmittel besteht aus Dimethylformamid mit 0,01 mol/L LiBr. Die Kalibrierung der GPC wird mit einem Set aus PMMA Standards durchgeführt. Für die Messung werde jeweils 300 μl Polymerlösung eingespritzt.

Charakterisierung der Polymere via ^1H -NMR

Für die Messung der Polymerzusammensetzung wurde ^1H -NMR verwendet.^[132] Für die NMR Analyse wird dann die Polymer/ D_2O -Lösung in ein NMR Röhrchen gefüllt. Dabei kann pro Membran nur ein NMR Röhrchen gefüllt werden, da für eine Füllung 1 ml Lösung benötigt wird. Die Lösung wird dann mit einem DMX 300 NMR Spektrometer von Bruker analysiert. Die Auswertung der NMR Daten erfolgt mit der Software SpinWorks 3.

4.7 Protein Adsorptionsmessungen

Wie in Abschnitt 2.2.1 bereits beschrieben, gibt es viele verschiedenen Möglichkeiten für die Interaktion eines Proteins mit einer Oberfläche. Die Adsorptionsmessungen dienen daher zu Ermittlung der Adsorptions-, Desorptionskapazitäten der Membranen. Mit diesen Messungen kann bestimmt werden wie stark eine Funktionalisierung die Adsorptionseigenschaften einer Membran ändert. Des Weiteren kann mit Hilfe der Adsorptionsmessungen eine qualitative Aussage über die Wechselwirkungen zwischen Membran und Protein getroffen werden. Die Adsorptions-, Desorptionskapazitäten können hierbei auf unterschiedliche Arten bestimmt werden.

4.7.1 Statische Adsorptionsmethode

Bei der statischen Adsorptionsmethode wird die Adsorption/Desorption der Membranen unter Gleichgewichtsbedingungen charakterisiert. Dazu wird zuerst eine Proteinlösung hergestellt. Diese Lösung besteht aus einem Puffer und dem Protein.

Der Puffer wird aus MilliQ-Wasser und HEPES (25 mmol/L) hergestellt, das HEPES stabilisiert den pH-Wert bei 7,4. In diesem Puffer werden dann die Proteine gelöst. Die verwendete Proteinmenge beträgt dabei mindestens 1,5-mal eine Monoschicht für die Membran. Bei PET-Membranen werden 0,75 mg Protein pro Membran verwendet und bei Cellulose 1,5 mg Protein pro Membran. Die Konzentration der Proteinlösung wird dabei auf 0,5 mg/ml eingestellt. Das heißt, für PET-Membranen werden 1,5 ml Proteinlösung und für Cellulose-Membranen werden 3 ml Proteinlösung verwendet.

Zur Messung der Adsorption werden die Membranen in ein verschließbares Polyethylen Weithalsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 50ml gegeben. Der Durchmesser dieses Gefäßes beträgt 50 mm und ist somit etwas größer als der Durchmesser der Membranen. Auf die Membranen wird dann die Proteinlösung gegeben. In Anschluss daran werden die Membranen 4 h auf einem Schüttler bei 100 rpm geschüttelt.

Nach der Adsorption werden die Membranen aus dem Adsorptionsgefäß genommen und gewaschen. Der Waschvorgang ist für alle Membranen gleich. Die Membranen werden hierbei zweimal 30 min in 10 ml HEPES-Puffer (25 mmol/L) gewaschen.

Danach wird das Protein wieder desorbiert. Die Desorption wird analog zu Adsorption durchgeführt. Die Desorptionslösung besteht wieder aus HEPES-Puffer, (25 mmol/L) allerdings wird diesem 1M NaCl zugesetzt. Für die Desorption werden die PET-Membranen in 1,5 ml Lösung für 4 h bei 100 rpm geschüttelt und die Cellulose-Membranen in 3 ml Lösung.

Charakterisierung der Proteinmenge

Die Charakterisierung der Proteinmenge nach Adsorption bzw. Desorption erfolgt mit einem BCATM Protein Assay Kit der Firma, Thermo Scientific und UV-Spektroskopie. Das BCATM Protein Assay Kit besteht aus zwei Komponenten, die BCA Reagent A und BCA Reagent B genannt werden. BCA Reagent A ist eine 0,1M NaOH Lösung die noch Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat enthält. BCA Reagent B besteht aus 4 % Kupfersulfatlösung. Aus den beiden Lösungen wird das Arbeitsreagenz gemischt, und zwar 50 Teile BCA Reagent A zu ein Teil BCA Reagent B. Mit diesem Reagenz können Protein-Konzentrationen von 20-2000 µg/ml bestimmt werden. Die Charakterisierung wird in einer 96er Titerplatte durchgeführt. Hierzu werden 25 µl Protein-Lösung in eine Kavität gegeben und 200 µl Arbeitsreagenz hinzugegeben. Die Mischung wird 30 min bei 37°C auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Während der Inkubation erfolgt ein Farbwechsel der Lösung von Grün nach Rosa. Die Intensität der rosa Farbe ist abhängig von der Konzentration der Proteinlösung. Im Anschluss an die Inkubation werden die Mischungen direkt mit einem UV-Spektrometer (µQuantTM Micoplattenspektrometer, BioTek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall), bei einer Wellenlänge von 562nm vermessen. Damit die Ergebnisse nicht verfälscht werden, sollte die UV-Messung direkt nach der Inkubation erfolgen. Um quantitative Ergebnisse zu erhalten muss eine Eichgrade erstellt werden. Diese wird aus Proteinlösungen mit bekannter Konzentration erstellt und muss bei jeder Messung erneut angefertigt werden. Mit Hilfe dieser Eichgrade kann dann aus der ermittelten UV-Absorption, der Steigung und dem Achsenabschnitt die Konzentration berechnet werden. Für die Eichgrade werden vier Protein-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0 mg/ml und 0,5 mg/ml verwendet.

4.7.1.1 Erstellung von Adsorptionsisothermen

Die Adsorptions-, Desorptionsisothermen werden nur mit den Cellulose-Membranen erstellt. Die Erstellung der Isothermen erfolgt mit Hilfe der in Abschnitt 4.7.1 beschriebenen statischen Adsorptionsmethode. Für die Isothermen werden wieder HEPES-Puffer und 3 ml Proteinlösung verwendet. Die Proteinkonzentrationen werden hierbei im Gegensatz zur statischen Adsorptionsmethode variiert. Es wird zwischen sehr kleinen und sehr großen Konzentrationen variiert. Konkret werden Konzentrationen von 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml und 1000 µg/ml verwendet. Für die Isothermen werden bei jeder Konzentration mindestens 3 Messungen durchgeführt.

Die Detektion der Proteinkonzentration wird bei Konzentrationen von > 40 µg/ml mit dem bereits beschriebenen (Abschnitt 4.7.1) BCATM Protein Assay Kit durchgeführt. Für Konzentrationen von < 40 µg/ml wird das Micro BCATM Protein Assay Kit verwendet. Dieses

Kit hat eine größere Auflösung in kleineren Konzentrationsbereichen. Der lineare Arbeitsbereich erstreckt sich von 2 µg/ml – 40 µg/ml. Für die Proteinbestimmung werden bei diesem Kit drei Reagenzien verwendet. Reagent A ist eine 0,1M NaOH Lösung, die noch Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat und Natriumtartrat enthält. Reagent B besteht aus 4 % Bicinchoninsäure in Wasser und Reagent C ist wieder eine 4 % Kupfersulfat Lösung. Auch hier wird wieder ein Arbeitsreagenz gemischt. Dieses besteht aus 25 Teilen Reagent A, aus 24 Teilen Reagent B und aus 1 Teil Reagent C. Das Arbeitsreagenz wird zu gleichen Teilen mit der Proteinlösung gemischt. Von jeder Lösung werden 150 µl in eine Kavität einer 96er Titerplatte pipettiert und 2 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Die Auswertung dieser Methode ist identisch mit der, des BCATM Protein Assay Kit. Auch hierbei werden, im Anschluss an die Inkubation, die Mischungen direkt mit einem UV-Spektrometer (µQuantTM Micoplatespectrometer, BioTek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall), bei einer Wellenlänge von 562nm, vermessen. Außerdem muss bei jeder Messung eine Eichgrade angefertigt werden.

Berechnung der Sorptionskonstanten

Zur Berechnung der Sorptionskonstanten werden die Messwerte (für eine Beschichtung) gegen die Konzentrationen der Lösungen nach der Adsorption aufgetragen. Dadurch werden die Isothermen der einzelnen Membranbeschichtungen erhalten. Um die Sorptionskonstanten zu bestimmen, wird nun ermittelt, welchem Plot die Isothermen folgen. In diesem Fall ist es der Langmuir Plot. Daher wird die Formel für die Langmuir Isothermen (10) verwendet.^[133]

$$q = \frac{K_L q_{\max} C_{eq}}{1 + K_L C_{eq}} \quad (10)$$

Da mit dieser Formel die Sorptionskoeffizienten nicht direkt berechnet werden können, werden die Isothermen linearisiert. Hierzu wird die Beladung des Sorbent durch die Konzentration der Lösung geteilt und gegen die Konzentration der Lösung aufgetragen (11;1).^[133] Der Langmuir Sorptionskoeffizient ergibt sich dann aus der maximalen Beladung des Sorbent und dem Achsenabschnitt (11;2). Zur Berechnung der maximalen Beladung des Sorbent wird die Steigung verwendet (11;3).^[133]

$$\frac{q}{C_{eq}} \text{ vs } C_{eq} \quad K_L = \frac{1}{q_{\max} b} \quad m = \frac{1}{q_{\max}} \quad (11)$$

Bei dieser Berechnungsmethode kann q_{\max} als Maß für die Genauigkeit der Rechnung genommen werden. Denn der Berechnete q_{\max} kann mit der experimentell bestimmten maximalen Ladung des Sorbent verglichen werden. Je geringer die Abweichung zwischen den beiden Werten ist, umso besser ist der Langmuir Plot.

4.7.2 Dynamische Adsorptionsmethode

Bei der dynamischen Adsorptionsmethode handelt es sich um eine Adsorptions-, Desorptionsmethode, welche in einem dynamischen System durchgeführt wird. Hierzu werden fünf funktionalisierte Membranen (\varnothing 32 mm) in eine Membranhalterung aus eigener Herstellung eingebaut. Die Messung erfolgt in einem ÄtkaTM Purfier System, der Firma Amersham Pharmacia (heute GE Pharmacia). Die Messungen werden bei einem Fluss von 0,25 ml/min durchgeführt. Für jede Messung wird eine 1 ml Probenschleife verwendet. In diese Probenschleife wird eine Proteinlösung, bestehend aus HEPES-Puffer (25 mmol/L), in dem 1,5 mg Protein gelöst sind, gefüllt. Als Laufmittel wird HEPES-Puffer (25 mmol/L) verwendet und für die Desorption des Proteins wird HEPES-Puffer (25 mmol/L) mit 1M NaCl benutzt. Die Messung wird wie folgt aufgeteilt:

Zuerst werden die Membranen mit 3 ml Laufmittel equilibriert, um eine stabile Basislinie zu erhalten. In Anschluss daran wird die Proteinlösung aus der Probenschleife zugegeben. Nach Abschluss der Adsorption wird mit 10 ml Laufmittel gewaschen. Danach erfolgt die Desorption. Hierzu werden 4 ml HEPES-Puffer (25 mmol/L) mit 1M NaCl in das System geleitet. Anschließend wird wieder auf das Laufmittel umgeschaltet und so lange gespült bis sich wieder eine stabile Basislinie einstellt (ca. 10ml). Die Adsorption, Desorption wird nach der Messung über die Flächen im Chromatogramm bestimmt. Um aus den Flächen im Chromatogramm auf die Konzentration der Proteinlösungen schließen zu können, muss eine Eichgrade aus Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen erstellt werden. Dazu werden die oben beschriebenen Messungen ohne Membranen in der Halterung durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen, welche für die Eichgrade verwendet werden, sind 0 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,75 mg/ml und 1,5 mg/ml. Die erhalten Flächen werden nun in einem Diagramm aufgetragen und aus der Steigung und dem Achsenabschnitt können dann die Konzentrationen für die Adsorption und die Desorption ermittelt werden.

4.8 Messungen der Protein Selektivität

Die Messung der IgG Selektivität ist eine entscheidende Analyse für die Antikörper-selektiven Membranen. Mit diesen Messungen wird getestet, welchen Einfluss die Funktionalisierungen der Membranen auf die Selektivität haben. Die Selektivität der Membranen zum IgG wird in dieser Arbeit mit HSA und Lysozym als Referenzproteine geprüft.

4.8.1 Einzelmessmethode

Die Einzelmessmethode ist die einfachste Methode zu Bestimmung der Selektivität. Bei dieser Methode wird die Selektivität über Messung der Kapazität für die einzelnen Proteine bestimmt. Die Kapazitäten werden hierbei wie in Abschnitt 4.7.1 ermittelt. Dazu werden in einen verschließbaren polyethylen Weithalsbehälter mit einem Fassungsvermögen von 50ml, eine Membran und 3 ml IgG-Lösung 0,5 mg/ml gegeben. Dieser wird dann 2 h bei 100 rpm geschüttelt, gewaschen und desorbiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt wieder mittels BCATM Protein Assay. Nach Waschen der Membran mit Ethanol und Wasser, wird diese getrocknet. Die Messung wird im Anschluss mit der gewaschene und getrocknete Membran wiederholt. Bei dieser Messung wird allerdings keine IgG-Lösung, sondern HSA bzw. Lysozymlösung verwendet. Um sicher zu gehen, dass kein Protein irreversibel an der Membran bindet, wird dieser Zyklus dreimal pro Protein durchgeführt und die Kapazitäten verglichen. Die Berechnung der Selektivität erfolgt nun über die mittleren Kapazitäten nach der Formel (12).^[134]

$$\alpha_{K_A/K_B} = \frac{K_A}{K_B} \quad (12)$$

Hierbei ist K_A die Gleichgewichtskonzentration von IgG nach der Adsorption bzw. Desorption, K_B ist die Gleichgewichtskonzentration von HSA bzw. Lysozym nach der Adsorption bzw. Desorption. Da in diesem Fall nur mit jeweils einem Protein gearbeitet wurde, kann K_A bzw. K_B als mittlere Kapazität der Membranen verwendet werden. Daraus ergibt sich dann die Selektivität α_{K_A/K_B} .

4.8.2 Mischungsmethode

Bei der Mischungsmethode erfolgt die Bestimmung der Selektivität auch mittels statischer Adsorption in einem verschließbaren Polyethylen Weithalsbehälter mit einem Fassungsvermögen von 50ml, wie in Abschnitt 4.7.1 beschrieben. Auch hierbei wird zu einer Membran 3 ml Proteinlösung mit einer gesamt Konzentration von 0,5 mg/ml gegeben. Diese Proteinlösung besteht aber aus 0,25 mg/ml IgG und 0,25 mg/ml HSA. Der Behälter mit Membran und Proteinlösung wird dann 2 h bei 100 rpm geschüttelt. Die Membran wird im Anschluss gewaschen und das Protein wird desorbiert. Bei den Messungen mit Lysozym

zeigte sich ein nicht erwarteter Abbau des IgG und es konnten daher keine Daten mit dieser Methode für die Lysozym/IgG-Mischungen gesammelt werden. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt bei dieser Methode nicht BCA™ Protein Assay, sondern mittels Elektrophorese oder GPC.

Elektrophorese

Die Elektrophorese wird in einem Mini-Protean® 3 Cell-System der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH aus München durchgeführt. Als Stromquelle wird ein Power Pac 300, ebenfalls von der Bio-Rad Laboratories GmbH, aus München verwendet. Das für die Elektrophorese verwendete Gel ist eine nicht denaturierende SDS-Page. Das Gel besteht aus zwei einzelnen Gelen. Das erste ist das Trenn-Gel. Dieses Gel besteht aus 1,91 ml Wasser, 0,89 ml Trenn-Puffer (Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8), 0,773 ml einer Acrylamid/Methacrylamid-Lösung (37,5/1, m/m, 30%), 35,7 µl SDS-Lösung (10%), 23,8 µl APS-Lösung und 2,38 µl TMEDA. Das Trenn-Gel füllt die Elektrophorese-Platte zu 2/3.

Das zweite Gel ist das Sammel-Gel. Dieses füllt das obere Drittel der Elektrophorese-Platte. Es besteht aus 0,85 ml Wasser, 0,357 ml Trenn-Puffer (Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8), 0,189 ml einer Acrylamid/Methacrylamid-Lösung (37,5/1, m/m, 30%), 14,25 µl SDS-Lösung (10%), 14,29 µl APS-Lösung und 2,38 µl TMEDA. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten, die dem Mini-Protean® 3 Cell-System beiliegen, gegossen. Dabei wird zuerst das Trenn-Gel in die Glasplatten gefüllt. Es wird dann ca. 5 min gewartet bis das Trenn-Gel sich etwas verfestigt. Danach wird das Sammel-Gel auf das Trenn-Gel gegossen. In das Sammel-Gel wird ein Einsatz gesteckt, durch den sich dann Kavitäten bilden. Das Gel sollte vor Verwendung mindesten 30 min aushärten. In Anschluss an das Aushärten wird der Einsatz für die Kavitäten entfernt und das Gel wird mitsamt den Glasplatten in die Elektrophorese-Kammer eingebaut.

In die Kammer werden dann ca. 500 ml Laufpuffer gegeben. Dieser Puffer besteht aus 400 ml Wasser, 7,55 g Tris, 47 g Glycin, 25 ml 10% SDS-Lösung und 3,5 g Natriumchlorid. Dann erfolgt die Probenvorbereitung. Hierfür werden 100 µl einer Probe mit 16,7 µl des Proben-Puffer versetzt. Für die Herstellung von 10 ml Proben-Puffer werden 7 ml Tris/HCl-Puffer (1,5 M, pH 6,8), 2 ml Glycerin, 0,4 g SDS und eine Spatelspitze Bromphenolblau gemischt. Von der Mischung aus Probe und Probenpuffer werden 10 µl in eine Kavität gegeben. Die Elektrophorese wird eingeschaltet und bei 60 mA für ca. 45 min laufen gelassen. Nach dieser Zeit sollten die Proben etwa 3/4 der Platte durchlaufen haben.

In Anschluss daran werden die Glasplatten aus der Kammer ausgebaut und das Gel wird vorsichtig zwischen den Glasplatten entfernt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Gel nicht zerreißt. Als nächstes wird das Gel mit Wasser gewaschen, und, um die Separation der Proteine im Gel sichtbar zu machen, wird das Gel gefärbt. Das Färben des Gels erfolgt mit

Brillant Blau. Dazu wird das Gel 2 h in 30 ml einer Lösung aus einer Spatelspitze Brillant Blau, 40% Ethanol, 10% Essigsäure und 50% Wasser gegeben und auf einem Schüttler bei max. 70 rpm 1 h geschüttelt. Danach ist das Gel komplett blau gefärbt. Um die Proteine zu erkennen, muss das Gel anschließend entfärbt werden. Das geschieht in ca. 100 ml Wasser über Nacht auf einem Schüttler bei max. 70 rpm. Zur Verbesserung der Entfärbung wird etwas Laborpapier mit in das Gefäß gelegt. Das Papier nimmt das Brillant Blau auf und es kann auf einen mehrmaligen Wasserwechsel verzichtet werden. Nach dem Entfärben sind die Proteinbanden zu erkennen. Mit dieser Methode kann die Selektivität allerdings nur qualitativ bestimmt werden.

GPC

Zur quantitativen Bestimmung wurden die Proteinlösungen mittels GPC analysiert. Die GPC Messungen erfolgen in einem Ätka™ Purfier System der Firma Amersham Pharmacia. Als GPC Säule wird eine Superdex 200 10/30 von Amersham Biosciences verwendet. Die Messungen werden bei einem Fluss von 0,25 ml/min durchgeführt. Für jede Messung wird eine 0,1 ml Probenschleife verwendet. Als Laufmittel wird eine Mischung aus PBS-Puffer 80 % und Acetonitril 20 % verwendet. Der PBS-Puffer besteht aus Natriumchlorid (137 mmol/L), Kaliumchlorid (2,7 mmol/L), Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat (10 mmol/L) und Natriumdihydrogenphosphat (2,25 mmol/L) in 1 L MilliQ-Wasser.

Vor der Messung muss die GPC-Säule mit dem Laufmittel equilibriert werden. Dazu werden mindesten zwei Säulenvolumen (48 ml) benötigt. Für die Equilibrierung wird das Laufmittel bei einem Fluss von 0,25 ml/min mindesten 3,2 h durch die Säule gepumpt. Dabei ist darauf zu achten, dass der Druck nicht über 1,2 MPa steigt und am Ende konstant bleibt.

Nach Equilibrierung der Säule kann die Messung gestartet werden. Dazu wird eine Probe in die Probenschleife gegeben. Die Messung läuft wie folgt ab: Zuerst wird 1 ml Laufpuffer durch die Anlage gepumpt und eine stabile Messung zu gewährleisten. Im Anschluss wird die Probenschleife geleert. Nach Leeren der Probenschleife wird dann noch 25 ml Laufmittel durch die Säule gepumpt, um sicher zu sein das Proteine und HEPES-Puffer von der Säule entfernt werden. Der erste Peak im Chromatogramm ist das IgG. Der IgG Peak geht von ca. 11 ml bis 17 ml. Der HSA Peak kommt bei ca. 17,5 ml und geht bis 22 ml.

Direkt im Anschluss daran wird das HEPES eluiert. Um aus den Flächen im Chromatogramm auf die Konzentration der Proteinlösungen schließen zu können, muss wieder eine Eichgrade, aus Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen, erstellt werden. Die für die Eichgrade verwendeten Proteinkonzentrationen sind 0,050 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml. Die erhalten Flächen werden in einer Grade aufgetragen und aus der Steigung und dem Achsenabschnitt kann dann die Protein-Konzentrationen berechnet werden. Außerdem werden Proteinmischungen mit

unterschiedlichen Zusammensetzungen getestet, um die Genauigkeit der GPC-Messung bestimmen zu können. Die Selektivität kann nun mittels Formel (12) berechnet werden.

4.8.3 Dynamische Messungen

Die Durchführung der dynamischen Selektivitätsbestimmung erfolgt zu großen Teilen gleich der dynamische Adsorptionsmethode (Abschnitt 4.7.2). Die Messung erfolgt auch hierbei in einem Ätka™ Purfier System, der Firma Amersham Pharmacia, mit fünf 32 mm Membranen und einem Fluss von 0,25 ml/min. Die Größe der Probenschleife, das Laufmittel und die Durchführung sind gleich mit den in Abschnitt 4.7.2 beschriebenen. Die dynamischen Messungen können auch wieder als Einzelmessmethode oder als Mischungsmethode durchgeführt werden.

Einzelmessmethode

Bei der Einzelmessmethode werden die Membranen genau wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben, vermessen. Die Messung erfolgt erst mit IgG-Lösung und dann mit HSA-Lösung. Dieser Wechsel wird zweimal pro Protein durchgeführt und die Flächen werden bestimmt. Dabei sollte es zu keiner Änderung in Laufe der Messungen kommen. Von den Flächen kann hierbei wieder mit Hilfe einer Eichgrade auf die Konzentration der Proteine geschlossen werden und mittels Formel (12) wird die Selektivität berechnet.

Mischungsmethode

Bei der Mischungsmethode werden dieselben Geräte, die gleiche Probenschleife und derselbe Puffer wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben verwendet. Die verwendete Proben-Lösung besteht allerdings aus 0,75 mg IgG und 0,75 mg HSA, die zusammen in 1ml HEPES-Lösung gelöst werden. Der Ablauf der Messung erfolgt nach dem gleichen Schema wie in Abschnitt 4.7.2. Zuerst werden die Membranen equilibriert, dann wird die Probe eingespritzt,. Es folgt der Adsorptionsschritt, das Waschen, die Desorption und ein erneuter Waschschrift. Bei der Desorption ergibt sich hierbei jetzt eine Änderung. Beim Start der Desorption wird die Lösung nicht mehr in einen Entsorgungsbehälter gefördert, sondern in einem Probengefäß aufgefangen. Diese Proben werden in Anschluss an die Messungen mittel GPC analysiert. Die GPC Analyse erfolgt wie in Abschnitt 4.8.2 (GPC) beschrieben. Die Selektivität kann nach Auswertung der GPC-Chromatogramme mittels Formel (12) berechnet werden.

5. Ergebnisse

5.1 Synthesen

Im Abschnitt Synthesen werden die Ergebnisse der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Synthese dargestellt. Dieser Abschnitt ist in zwei Unterabschnitte aufgeteilt: Der erste Unterabschnitt fasst die Ergebnisse der Monomer-Synthesen zusammen und der zweite die Synthesen der Photoinitiatoren.

5.1.1 Monomere

5-(Methacrylamino)-m-xylobis(lithiumphosphate)-dimethylester

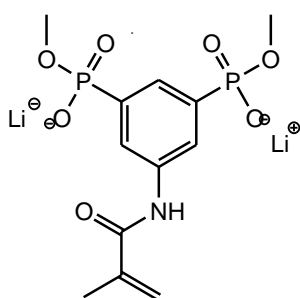


Abbildung 5.1 Struktur von 5-(Methacrylamino)-m-xylobis(lithiumphosphate)-dimethylester

Die vier Stufen Synthese von 5-(Methacrylamino)-m-xylobis(lithiumphosphate)-dimethylester (Abb. 5.1) ist nach Stufe drei und vier mittels ^1H -NMR und IR-Spektroskopie analysiert worden. Das ^1H -NMR-Spektrum von 5-(Methacrylamino)-m-xylobisphosphonsäure-tetramethylester wird in Abbildung 5.2 dargestellt. Es ist in CDCl_3 mit einem 300 MHz Spektrometer gemessen worden. Dabei entspricht das Spektrum weitgehend dem simulierten Spektrum. Die Peaks bei 1,95 ppm, 3,29 ppm, 3,74 ppm, 5,64 ppm, 6,19 ppm und 7,70-8,34 ppm können klar den 5-(Methacrylamino)-m-xylobis(lithiumphosphate)-dimethylester zugeordnet werden (Abschnitt 4.1.1) und entsprechen annähernd den simulierten Werten. Die Peaks bei 1,41 ppm und bei 2,5 ppm deuteten darauf hin, dass Triethylamin nicht vollständig entfernt werden konnte. Zusätzlich deutet der recht intensive Peak bei 2,5 ppm und die breite Verteilung bei 7,70-8,34 ppm darauf hin, dass noch etwas eingesetztes 5-Nitro-m-Xylol im Produkt enthalten war. Der Peak bei 7,26 ppm war klar den NMR-Lösungsmittel CDCl_3 zu zuordnen.

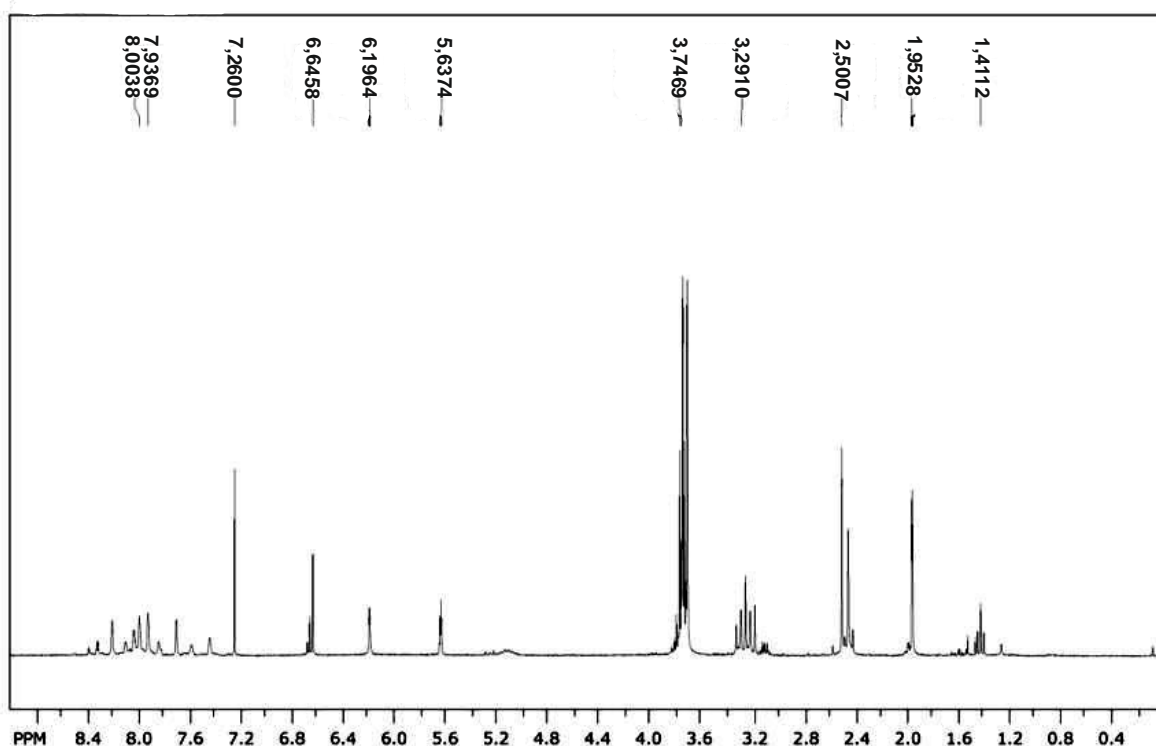


Abbildung 5.2 ^1H -NMR Spektrum von 5-(Methacrylamino)-*m*-xylobisphosphonsäure-tetramethylester

Das ^1H -NMR Spektrum der vierten Stufe 5-(Methacrylamino)-*m*-xylobis-lithiumphosphate-dimethylester (Abb. 5.3) zeigt bis auf minimale Abweichungen die gleichen Peaks wie das Spektrum der dritten Stufe. Das ^1H -NMR Spektrum ist wieder in CDCl_3 mit einem 300 MHz Spektrometer gemessen worden. Auch bei diesem Spektrum können die Peaks bei 1,95 ppm, 3,29 ppm, 3,74 ppm, 5,66 ppm, 6,21 ppm und 7,45-8,21 ppm dem Produkt zugeordnet werden (Abschnitt 4.1.1). Die Peaks bei 1,23-1,41 ppm und bei 2,5 ppm deuteten darauf hin, dass auch in der vierten Stufe noch Triethylamin enthalten ist. Zusätzlich dazu deutet der recht intensive Peak bei 2,5 ppm und die breite Verteilung bei 7,70-8,34 ppm darauf hin, dass weiterhin 5-Nitro-*m*-Xylol im Produkt enthalten ist. Der Peak bei 7,26 ppm konnte wieder klar dem NMR-Lösungsmittel CDCl_3 zugeordnet werden.

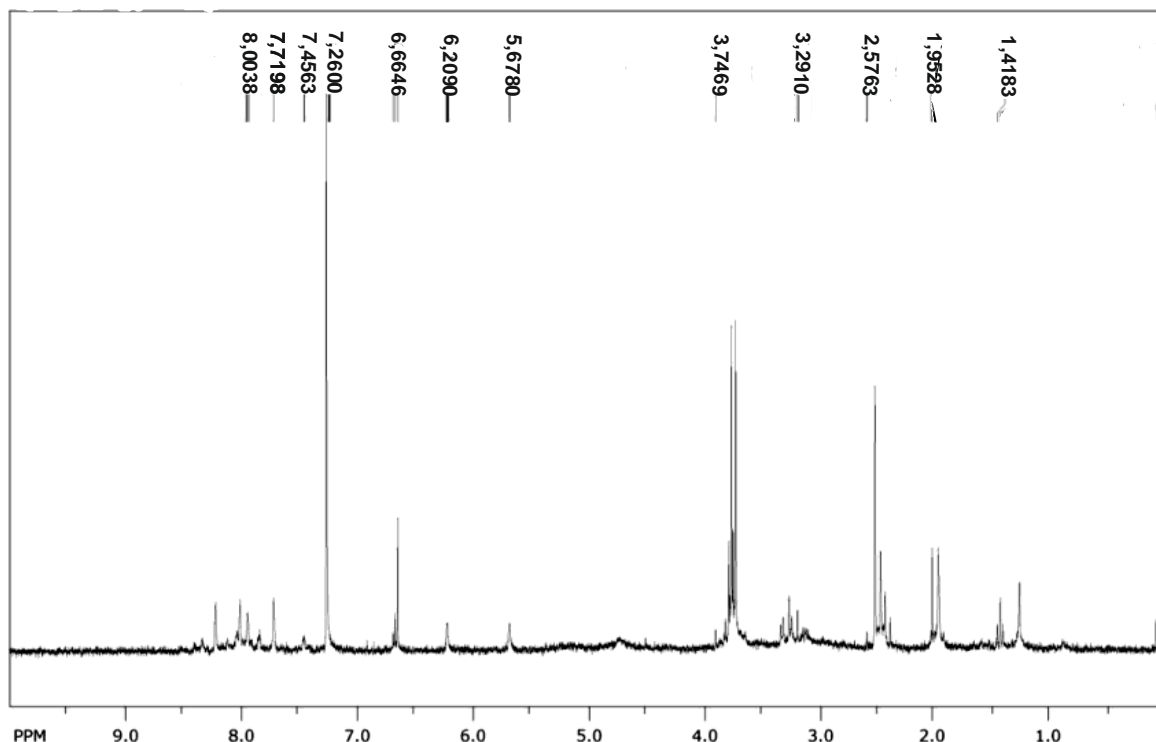


Abbildung 5.3 ^1H -NMR Spektrum von 5-(Methacrylamino)-m-xylol-bislithiumphosphate-dimethylester

Um eine klare Unterscheidung zwischen Stufe drei und vier treffen zu können, ist von diesen Stufen jeweils ein IR-Spektrum aufgenommen worden. Der Vergleich dieser Spektren ist in Abbildung 5.4 aufgetragen. Beide Spektren zeigen einen ähnlichen Verlauf. Im Spektrum der Stufe 4 ist aber die Bande bei 1180 cm^{-1} deutlich ausgeprägter als im Spektrum der Stufe 3. Die Bande bei 1180 cm^{-1} ist charakteristisch für die $\text{P}=\text{O}$ Valenzschwingung, welche auch bei dem 5-(Methacrylamino)-m-xylolbislithiumphosphate-dimethylester ausgeprägter sein sollte, da in diesem Produkt zwei $\text{P}=\text{O}$ Schwingungen mehr vorhanden sind als beim 5-(Methacrylamino)-m-xylolbislithiumphosphonsäure-tetramethylester. Auch die Schwingung für das Kristallwasser im Bereich von 3400 cm^{-1} ist bei dem 5-(Methacrylamino)-m-xylolbislithiumphosphate-dimethylester ausgeprägter. Das liegt daran, dass im Produkt der Stufe 4 mehr Ladungen enthalten sind. Durch diese Ladungen kann eine größere Menge Kristallwasser an das Produkt gebunden werden, als am ungeladene Produkt der Stufe 3. Im Gegensatz dazu waren die Banden bei 2900 cm^{-1} , bei 2280 cm^{-1} , und bei 1740 cm^{-1} im Spektrum der Stufe 3 ausgeprägter. Durch die Bande bei 2900 cm^{-1} wird die CH_3 -Valenzschwingung angezeigt. Daher ist diese Bande ein guter Indikator für ein erfolgreiches Abspalten von zwei CH_3 -Gruppen. Die Bande bei 2280 cm^{-1} zeigt die Valenzschwingung zwischen $\text{P}=\text{O}-\text{C}$ an und die Bande bei 1740 cm^{-1} zeigt die Deformationsschwingung von $\text{O}-\text{C}-\text{H}$ Bindungen an. Beide Gruppen kommen im Produkt der Stufe 3 deutlich häufiger vor als im Produkt der Stufe 4. ^[135]

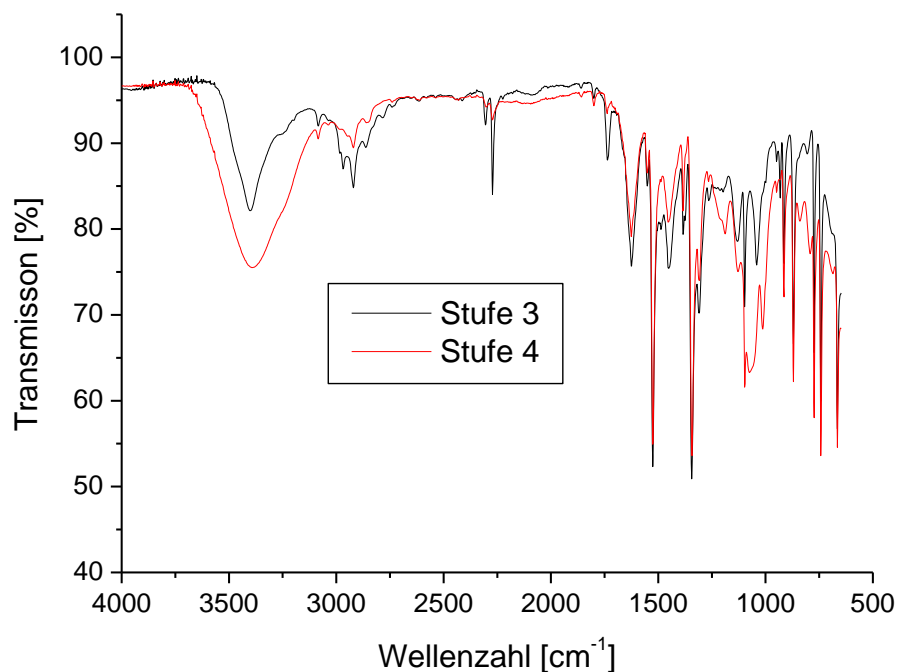


Abbildung 5.4 Vergleich der IR-Spektren von Stufe 3 und Stufe 4.

6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid- β -cyclodextrin

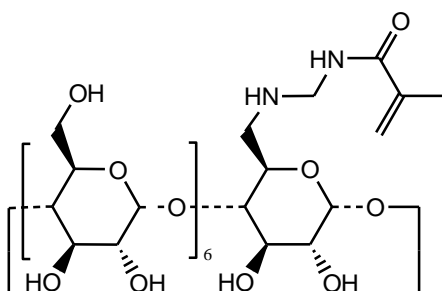


Abbildung 5.5 Struktur von 6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid- β -cyclodextrin

Bei der drei Stufen Synthese von 6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid- β -cyclodextrin (Abb. 5.5) ist das Produkts nach der Stufe 3 mittels ^1H -NMR analysiert worden. Das Ergebnis dieser Messung wurde in Abbildung 5.6 aufgetragen. Das ^1H -NMR-Spektrum ist in D_2O mit einem 300 MHz Spektrometer aufgenommen worden. Dem Produkt können hierbei die Peaks bei 1,94 ppm, 2,51-3,03 ppm, 3,18-3,73 ppm, 5,05 ppm 5,75 ppm und 6,14 ppm zugeordnet werden (Abschnitt 4.1.2). Dem Peak bei 4,79 ppm ist Wasser aus dem Lösungsmittel zuzuordnen. Für die Peaks zwischen 1,16 ppm und 1,33 ppm war Ethanol, das zum Ausfällen verwendet worden ist, verantwortlich, und die Peaks bei 1,43-1,73 ppm sind von geringen Mengen Ethylendiamin aus der zweiten Stufe verursacht worden.

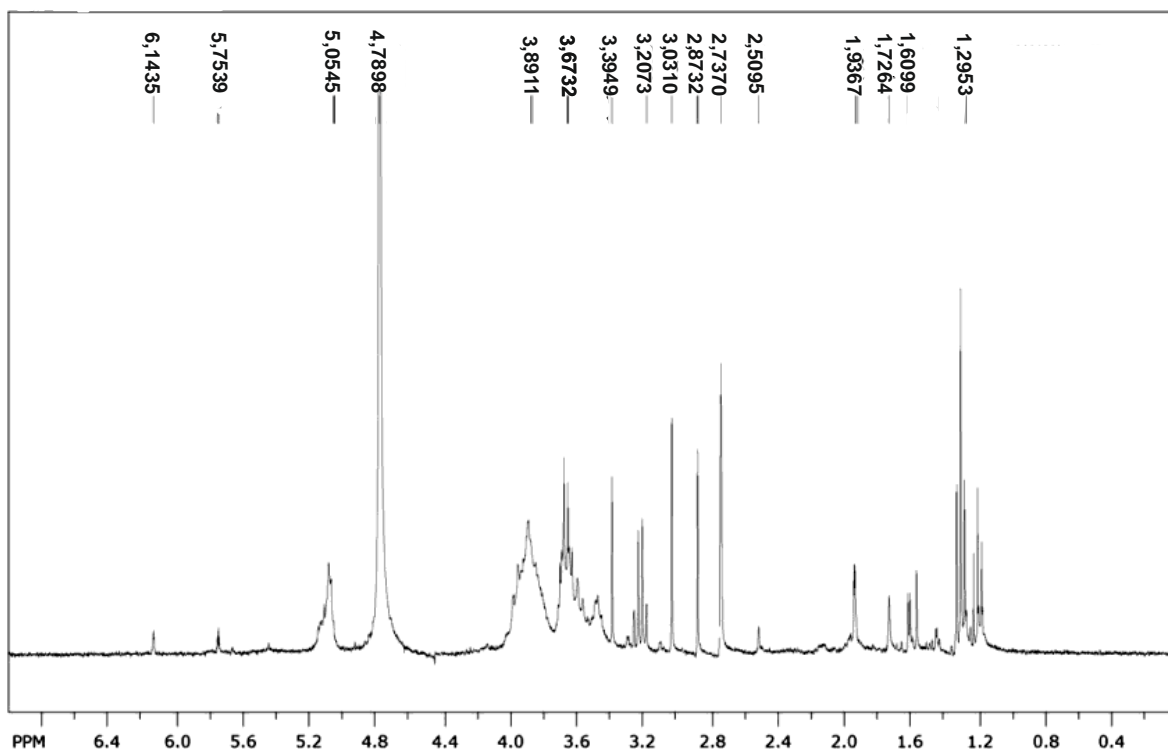


Abbildung 5.6 ^1H -NMR Spektrum von 6'-Deoxy-6'-(N-(2-methyl)methacrylamid)- β -cyclodextrin

N-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat

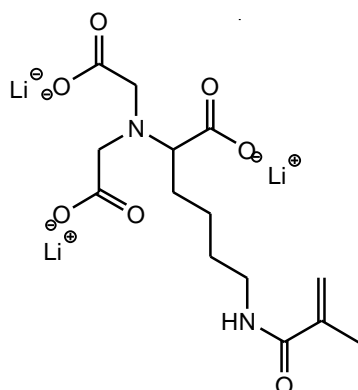


Abbildung 5.7 Struktur von N-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat

Bei der drei Stufen Synthese vom N-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat (Abb. 5.7) ist das Produkt nach Stufe zwei und drei mittels ^1H -NMR analysiert worden. Das ^1H -NMR-Spektrum der zweiten Stufe ist in CDCl_3 mit einem 300 MHz Spektrometer aufgenommen worden. Von den erhaltenen Peaks in Abbildung 5.8 können die Peaks bei 1,23 ppm, 1,63-1,73 ppm, 1,82 ppm, 1,95 ppm, 3,29 ppm, 3,41 ppm, 3,59 ppm, 3,67ppm, 5,27 ppm, 5,67 ppm, 5,99 ppm und 6,13 ppm dem Produkt zugeordnet werden. Der Peak bei 7,26 ppm ist dem Lösungsmittel CDCl_3 und der bei 2,14 ppm Aceton

zuzuordnen. Dieses ist zum Reinigen der NMR-Röhrchen verwendet worden. Der Peak bei 4,10 ppm ist auf Reste von Ethylbromacetat aus dem ersten Reaktionsschritt zurückzuführen.

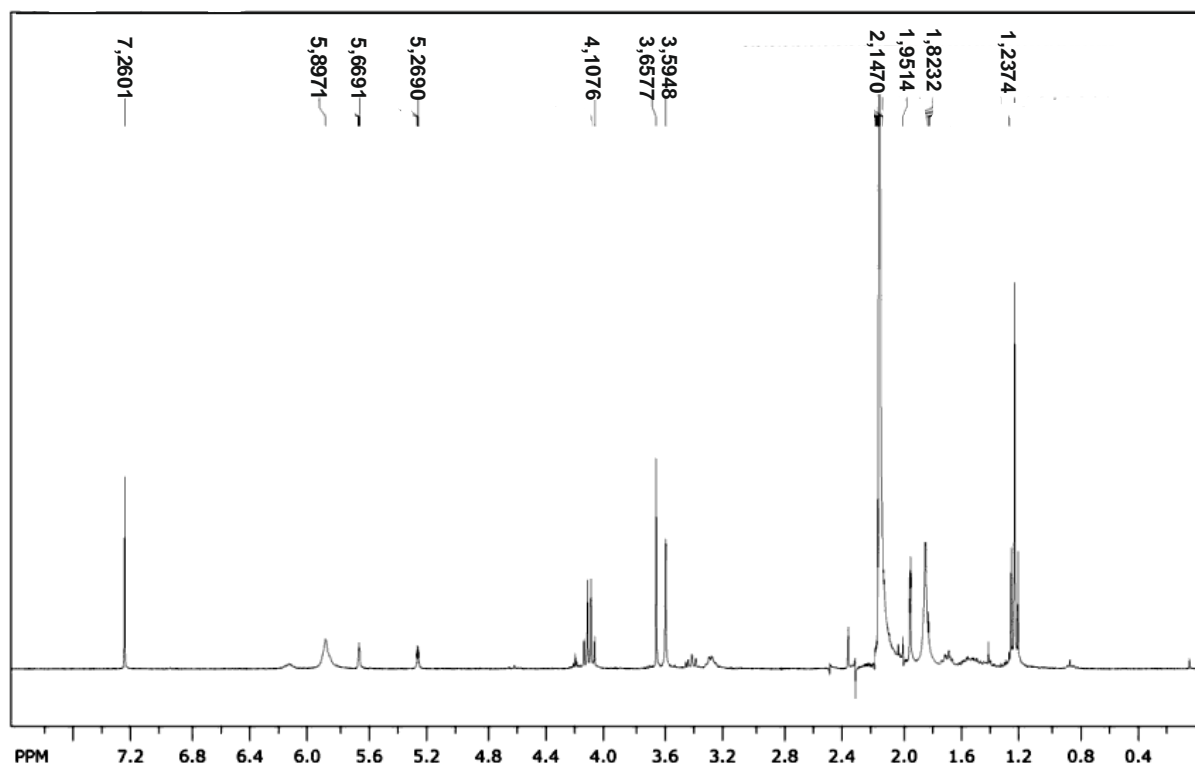


Abbildung 5.8 ^1H -NMR Spektrum von N-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N-bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)-L-lysine methylester

Das ^1H -NMR-Spektrum der dritten Stufe ist in D_2O mit einem 300 MHz Spektrometer aufgenommen worden. Das Spektrum ist in Abbildung 5.9 aufgetragen. Von den erhaltenen Peaks können die Peaks bei 1,20-1,48 ppm, 1,49-1,63 ppm, 1,65-1,75 ppm, 1,92 ppm, 2,99-3,07 ppm, 3,13 ppm, 3,23 5,41 ppm und 5,64 ppm dem Produkt zugeordnet werden. Alle Peaks sind dabei im Vergleich zur Referenz leicht tieffeldverschoben. Der Peak bei 4,79 ppm gehört dem Lösungsmittel D_2O . Der Peak bei 2,21 ppm ist wieder Aceton und der Peak bei 2,39 ppm stammt von Methacrylsäure Resten aus der dritten Stufe.

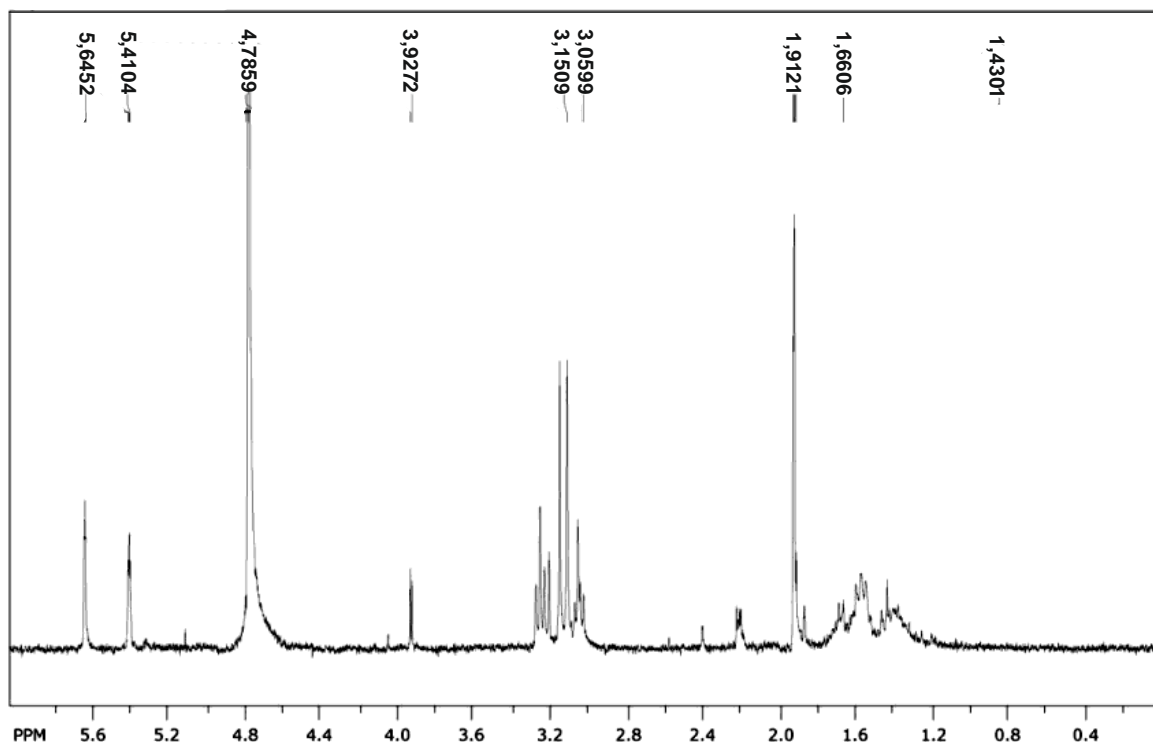


Abbildung 5.9 ^1H -NMR Spektrum von *N*-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*-bis(carboxymethyl)-L-lysintrilithium

5.1.2 Photoinitiatoren

4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure

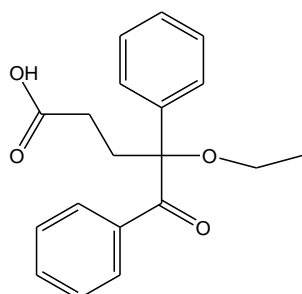


Abbildung 5.10 Struktur von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure

Bei der Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure (Abb. 5.10) ist das Produkt an Ende mit ^1H -NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie und Elementaranalyse untersucht worden. Das ^1H -NMR-Spektrum von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure ist in Abb. 5.11 aufgetragen. Es ist mit einem 300 MHz Spektrometer aufgenommen worden und als Lösungsmittel ist CDCl_3 verwendet worden. Die Integration der Peaks deutete darauf hin, dass die Peaks bei 1,07-1,12 ppm, 2,17-2,31 ppm, 2,40-2,50 ppm, 2,60-2,71 ppm, 3,10-3,22 ppm, 3,51-3,65 ppm, 7,20-7,50 ppm und 7,96-7,99 ppm dabei zum Produkt gehören. Bei der Integration der Peaks bei 1,07-1,12 ppm sind 3 H-Atome, wie im simulierten NMR, erhalten

worden. Bei der Integration aller Peaks zwischen 1,82-2,71 ppm sind 4 H-Atome gefunden worden, also genau so viele wie in der Simulation bei 2,17-2,23 ppm. Dasselbe gilt für die Integration der Peaks zwischen 3,10-3,65 ppm. Hier sind 2 H-Atome erhalten worden. Bei der Simulation liegen diese bei 3,41 ppm. Die Integration der Peaks von 7,2-7,5 ppm ergibt 6 H-Atome, diese entsprechen den Peaks 7,34 ppm und 7,44 ppm in der Simulation. Auch der letzte Peak bei 7,96-7,99 ppm zeigt 2 H-Atome, wie in der Simulation bei 7,98 ppm. Der Peak genau bei 7,26 ist dem Lösungsmittel CDCl_3 zuzuordnen, und der Peak bei 2,17 ppm ist vom Aceton mit dem die NMR-Röhrchen gereinigt worden sind.

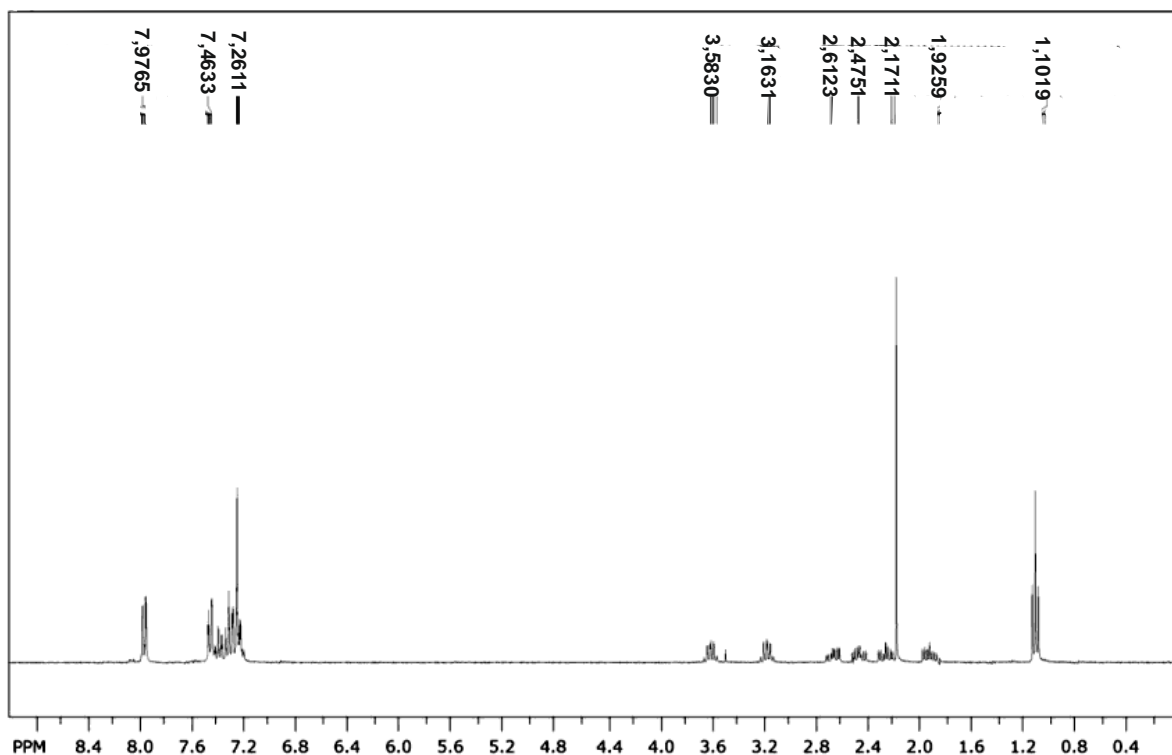


Abbildung 5.11 ^1H -NMR Spektrum von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäure

Auch die Ergebnisse der Elementaranalyse (Tab. 5.1) zeigen eine gute Reinheit der 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenyl-pentanosäure. Die Ergebnisse zeigen einen Kohlestoff (C) Gehalt von 69,53 %. Dieser Wert ist etwa 3,5% geringer als der theoretische Wert. Beim Wasserstoff (H) stimmen der theoretische und der ermittelte Wert gut überein. Auch der Sauerstoff (O) Gehalt stimmt gut mit dem theoretischen Wert überein, ist aber ca. 1% größer. Die Werte des für den Kohlenstoff und den Sauerstoff Gehalt deuteten darauf hin, dass noch DMSO enthalten war. Das DMSO ist als Lösungsmittel verwendet worden.

Tabelle 5.1 Ergebnisse der Elementaranalyse für 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure

SS 6	Theoretisch [%]	Ergebnis [%]
C	73,06	69,53
H	6,45	6,17
O	20,49	21,73

Der Vergleich von ^1H -NMR und Elementaranalyse zeige jedoch eine hohe Reinheit und es sind keine Nebenprodukte gefunden worden. Allerdings deutet die Elementaranalyse darauf hin, dass noch DMSO im Produkt enthalten war.

4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid

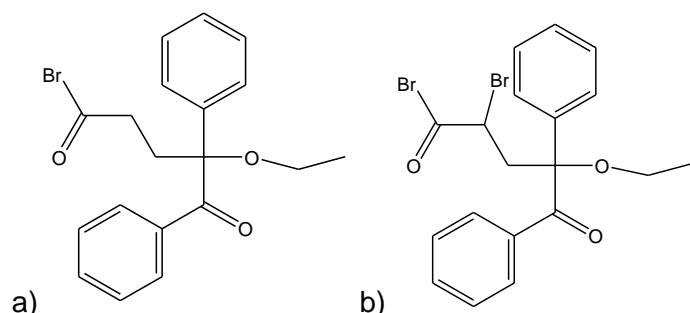


Abbildung 5.12 Struktur von a) 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid, b) 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure-bromid

Bei der Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid (Abb. 5.12 a.) ist das Produkt an Ende mit ^1H -NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie und Elementaranalyse untersucht worden. Das ^1H -NMR-Spektrum von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid ist in Abb. 5.13 aufgetragen. Es ist mit einem 300 MHz Spektrometer aufgenommen worden und als Lösungsmittel ist CDCl_3 verwendet worden. Die Peaks bei 1,07-1,12, 1,82-1,93 ppm, 2,16-2,27 ppm, 2,41-2,52 ppm, 2,60-2,70 ppm, 3,12-3,21 ppm, 3,54-3,68ppm, 7,21-7,51 ppm und 7,96-8,02 ppm sind dem Produkt zu zuordnen. Die anderen Peaks bei 1,17-1,31 ppm, 4,01-4,07 ppm, 5,57 ppm deuten auf das Nebenprodukt 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure-bromid (Abb. 5.12 b.) hin. Auch zeigen die Integrationen bei 3,54-3,68ppm, 7,21-7,51 ppm und 7,96-8,02 ppm dass ein Nebenprodukt enthalten ist. Diese Integrale sind größer als für das reine Produkt zu erwarten gewesen wäre.

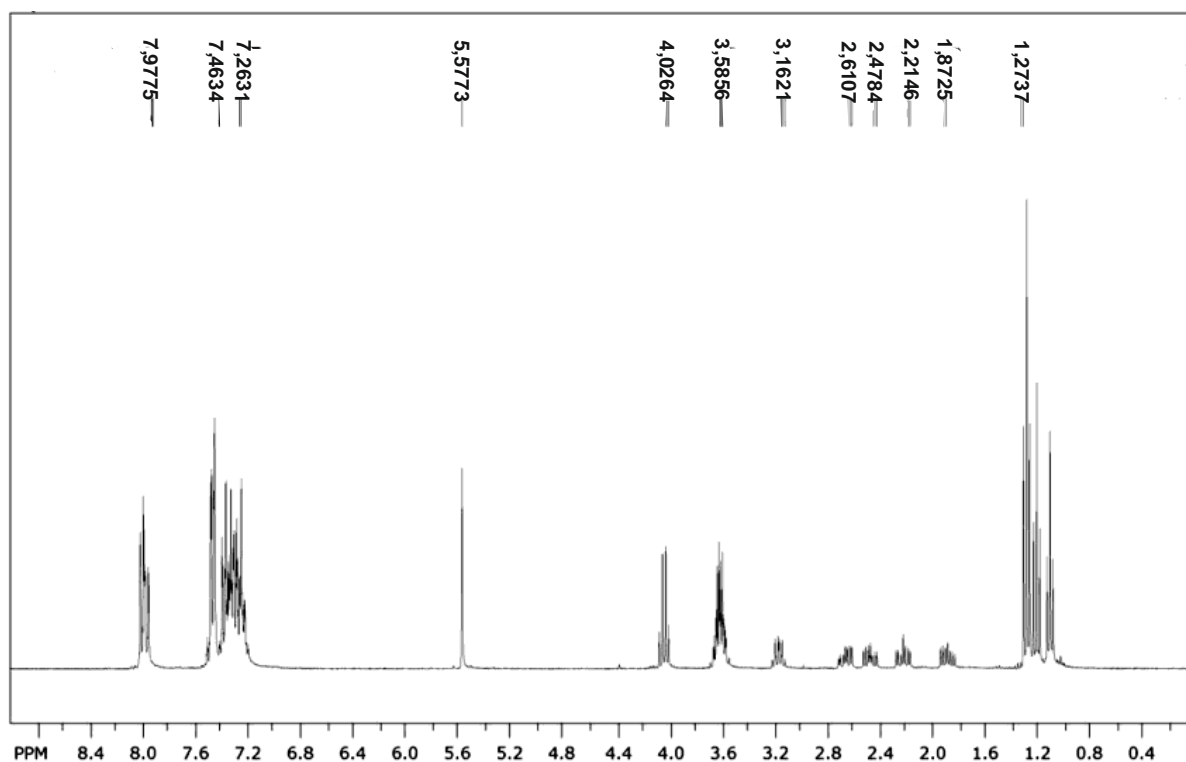


Abbildung 5.13 ^1H -NMR Spektrum von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid

Die Ergebnisse der Elementaranalyse für 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure-bromid zeigen auch, dass noch 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure-bromid (SSBr_2) enthalten war. Die Ergebnisse für den Kohlenstoff- und Wasserstoff- Gehalt liegen mit 55,73% bzw. 4,21% genau zwischen den Theoretischen Werten für 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäurebromid und 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid. Auch der Brom Gehalt deutete darauf hin, dass es sich um eine Mischung zwischen den zwei Produkten handelte. Allerdings wich der Sauerstoff Gehalt von beiden Theoretischen Werten ab. Der Sauerstoff Gehalt deutete darauf hin, dass auch noch etwas Oxidierter Phosphor enthalten war. Die Reinheit dieses Produktes lag also nur bei ca. 50%.

Tabelle 5.2 Ergebnisse der Elementaranalyse für 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäurebromid (SSBr) und Theoretische Werte von 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid (SSBr_2)

SSBr	Theoretisch [%]	Ergebnis [%]	SSBr₂	Theoretisch [%]
C	60,81	55,73	C	50,25
H	5,1	4,21	H	3,99
O	12,79	14,72	O	10,57
Br	21,29	28,71	Br	35,19

Weiterhin sind noch IR-Spektren von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure und 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid angefertigt worden, um noch eine weitere Methode zur Unterscheidung der beiden Photoinitiatoren zur Verfügung zu haben. Der Vergleich dieser Spektren ist in Abbildung 5.14 aufgetragen. Die Spektren beider Photoinitiatoren zeigen einen ähnlichen Verlauf. Unterschiede dieser Spektren sind hauptsächlich im Bereich um 3400 cm^{-1} zu beobachten. Dieser Bande lassen sich die O-H Valenzschwingungen zuordnen. Ein Verschwinden dieser Bande im Spektrum von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid zeigte also, dass die OH-Gruppen durch Brom-Gruppen ausgetauscht worden sind. Auch zeigt der etwas unterschiedliche Verlauf im Fingerprintbereich, unter 1000 cm^{-1} , dass es sich um verschiedene Produkte handelt. Besonders bei den Wellenzahlen um 500 cm^{-1} ist das deutlich zu sehen. Diese Wellenzahlen zeigen spezifische C-Br Schwingungen und somit die Anwesenheit von Brom in einer Verbindung.^[135]

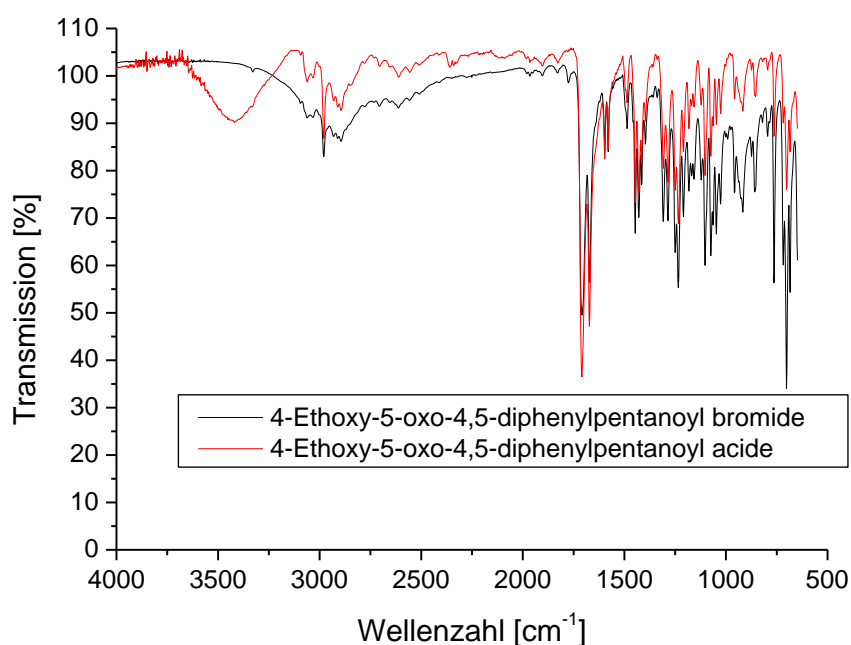


Abbildung 5.14 Vergleich der IR-Spektren von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäure und 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäurebromid

Alle drei Messmethoden zeigen, dass die Bromierung von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäure durchgeführt werden konnte. Allerdings deuteten besonders die Elementaranalyse und die ¹H-NMR-Messungen darauf hin, dass das erhaltene 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentanosäurebromid deutliche Mengen an Nebenprodukt enthielt. Bei diesem Nebenprodukt handelte es sich um 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid.

5.2 Pfropfung von PET-Membranen

Bevor die ersten Pfropf-Polymerisationen auf PET-Membranen durchgeführt worden sind, sind die Basismembranen analysiert worden. Dabei sind die spezifische Oberfläche, die Permeabilität, die Porengröße und der Kontaktwinkel bestimmt worden. Außerdem sind REM-Aufnahmen von den Membranen angefertigt worden. Eine REM-Aufnahme der Basismembran ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Die Bestimmungen sind wie in Abschnitt 4.4 beschrieben durchgeführt worden. Für die Oberfläche ist ein Wert von durchschnittlich $1,23 \text{ m}^2/\text{g}$ gefunden worden. Diese spezifische Oberfläche ist im Anschluss dazu verwendet worden, um den DG-Wert der gepfropften Membranen nach Formel (2) berechnen zu können. Die ermittelte Porengröße der Membranen liegt bei $630 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$. Der Porendurchmesser der Basismembranen ist also nicht wie von Hersteller angegeben 400 nm sondern größer. Für die Permeabilität ergab sich ein Wert von $20500 \text{ L/h bar m}^2$ und die Messungen des Kontaktwinkels ergaben einen Wert von 55° für die Basismembranen. Dieser Wert ist auch schon in der Literatur^[124] aufgeführt.

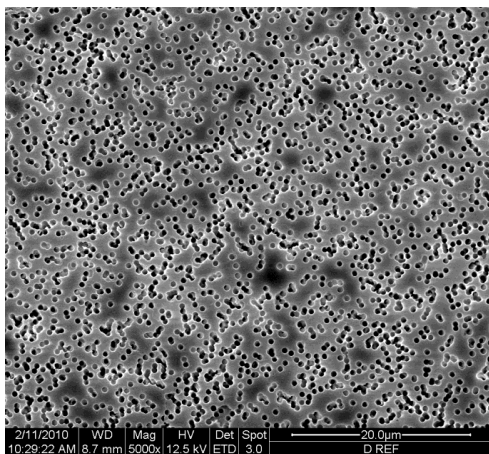


Abbildung 5.15 REM-Aufnahme einer PET-400 Basismembran.

5.2.1 Pfropfungsgrad

Für die Pfropf-Polymerisationen sind PET-400 Membranen nach der Methode 1 (Abschnitt 4.2.1) vorbereitet worden. Der Photoinitiatoranteil in der Reaktionslösung betrug 100%. Die Pfropf-Polymerisation ist wie in Abschnitt 4.3 beschrieben durchgeführt worden. In den Reaktionslösungen sind nur die maßgeschneiderten Monomere bzw. Monomermischungen verwendet worden. Die verwendeten Monomere bzw. Monomermischungen sind auf der X-Achse in Abbildung 5.16 aufgetragen. In Abbildung 5.16 selbst sind die Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Monomere trotz gleicher reaktiver Methacrylat-Gruppe (Abb.3.3), deutlich unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen.

Hierbei zeigt sich, dass die Homopolymere im Durchschnitt geringere DG-Werte erreichen als die Co-Polymere. Besonders geringe DG-Werte werden mit den geladenen Monomeren

Bis mit $0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und Ammo mit $0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht. Auch das β -Cyc Monomer mit der sehr großen β -Cyclodextrin-Gruppe zeigt einen geringen DG-Wert mit nur $0,51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Hohe DG-Werte werden dagegen vom relativ kleinen Monomer 2-Hydr mit $2,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und dem hydrophoben Dode Monomer mit $2,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht. Wie bereits erwähnt, konnte der DG-Wert durch Co-Polymerisation zum Teil deutlich erhöht werden. Besonders stark fiel diese Erhöhung bei der Kombination von den beiden geladenen Monomeren Bis und Ammo aus. Dieses Co-Polymer zeigt ein DG-Wert $2,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und damit einen um den Faktor zwanzig größeren DG-Wert als bei der Homopolymerisation. Die größten DG-Werte sind mit den Co-Polymeren aus Bis/Dode mit $2,71 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und Dode/Ammo mit $2,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht worden. Auch die Mischungen von β -Cyc mit den anderen Monomeren führen zu einem höheren DG-Wert. Diese Erhöhung ist aber mit einem Faktor von zwei nicht so ausgeprägt wie bei anderen Co-Polymeren.

Als Ausnahme von dieser Tendenz zeigt sich das ebenfalls hydrophobe C-Hex Monomer. Dieses zeigt mit einem DG-Wert von $0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ einen im Vergleich zum Dode Monomer geringen DG-Wert. Auch die Co-Polymerisationen zeigen keine deutliche Erhöhung. Die erzielte Erhöhung lag dabei im Bereich des Fehlers. Die Abweichung der Messungen ist aus den DG-Werten von mindestens drei Beschichtungen mit dem gleichen Monomer berechnet worden und liegt für alle Monomere und Mischungen konstant zwischen 18 % und 20%.

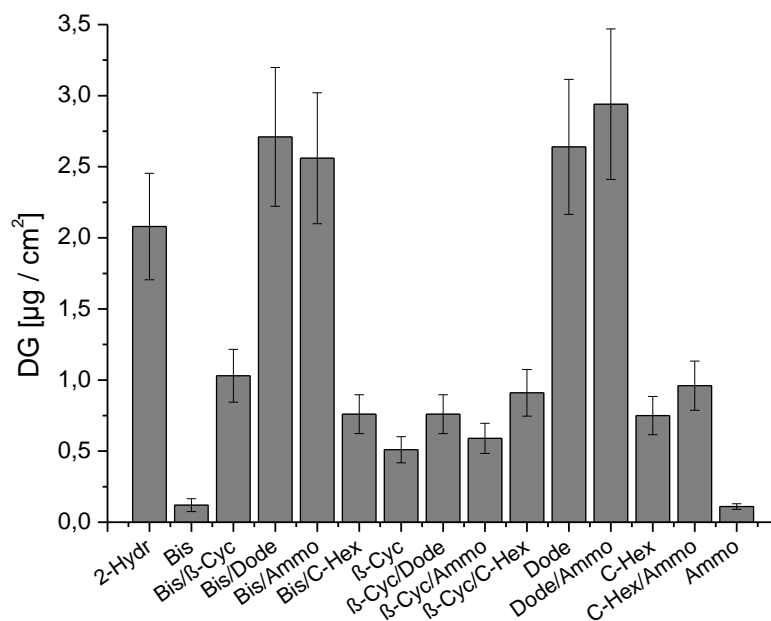


Abbildung 5.16 Ergebnisse der Pfropf-Polymerisation auf PET-Membranen

5.2.2 Kontaktwinkel der Membranen

Die Kontaktwinkelmessungen sind wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben durchgeführt worden. Bei den Messungen sind dieselben Membranen wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, modifiziert worden. Diese Membranen weisen dabei die gleichen DG-Werte auf, wie in Abbildung 5.16 dargestellt. Zusätzlich zu den gepfropften Membranen sind noch Basismembranen, Membranen nach der Aminolyse und Membranen mit gebundenem Photoinitiator vermessen worden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

Wie bereits beschrieben zeigt die Basismembran bei diesen Messungen einen Kontaktwinkel von 55°. Durch die Reaktion mit dem Amin ist der Kontaktwinkel um 10° verringert worden und die Membran hat einen hydrophileren Charakter. Im Gegensatz dazu ist der Kontaktwinkel für Membranen mit gebundenem Photoinitiator mit 80,2° recht hoch. Nach den verschiedenen Modifizierungen zeigen die Kontaktwinkel starke Abhängigkeiten von den verwendeten Monomeren.

Je nach Monomer sind entweder höhere oder niedrigere Kontaktwinkel erhalten worden. Für die geladenen bzw. stark hydrophilen Monomere wie Bis, Ammo oder 2-Hydr, β -Cyc ist ein geringerer Kontaktwinkel gefunden worden. Dieser zeigt Werte bis hinunter zu 10°. Auch die Co-Polymere dieser Mischungen zeigen ebenfalls niedrige Kontaktwinkel. Als Ausnahme davon präsentiert sich das Co-Polymer aus Bis und Ammo. Dieses zeigt einen größeren Kontaktwinkel als die beiden Homopolymere. Allerdings ist auch dieser Kontaktwinkel noch kleiner als 45°. Für die Beschichtungen mit dem hydrophoben Dode-Monomer sind große Kontaktwinkel von > 90° detektiert worden. Dieser hohe Kontaktwinkel ist aber nur noch für das Co-Polymer aus Dode und Ammo erhalten worden. Alle anderen Co-Polymere mit Dode zeigen Kontaktwinkel im Bereich von 50°.

Auch bei den Kontaktwinkelmessungen wurde der Fehler bestimmt. Dieser ist aus den Messungen von mindestens drei Membranen mit gleicher Beschichtung berechnet worden. Pro Messung ist der Kontaktwinkel an fünf Stellen auf einer Membran bestimmt worden. Der daraus errechnete Fehler ist mit ca. 5% recht gering gewesen.

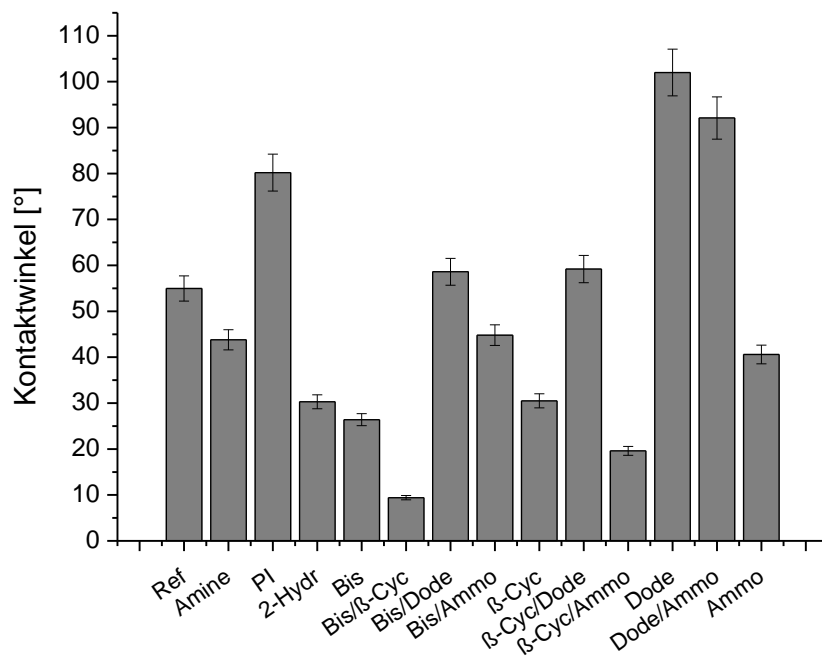


Abbildung 5.17 Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen auf den PET-Membranen

5.2.3 Permporometrie Daten und Permeabilität der Membranen

Die Permporometrie Messungen sind wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben durchgeführt worden. Für die Ergebnisse ist dabei der durchschnittliche Porendurchmesser aus drei Messungen berechnet worden. Diese Messungen sind jeweils mit drei Membranen mit gleicher Funktionalisierung durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in Abbildung 5.18 und Tabelle 5.3 aufgetragen.

Wie schon erwähnt, zeigen die Daten, dass der Porendurchmesser der Basismembranen nicht wie vom Hersteller angegeben 400 nm betrug, sondern $630 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$. Weiterhin zeigen die Daten, dass die Reaktion mit dem Amin DEEDA zu einer Vergrößerung des Porendurchmessers führt. Durch das Amin ist der Porendurchmesser um ca. 60 nm erhöht worden. Die Pfropf-Polymerisationen haben dann wieder zu einer Verringerung des Porendurchmessers geführt. Die Abbildung 5.18 zeigt dazu noch, dass die Verteilung der Poren sich auf einen kleinen Bereich von 50 nm bis 100 nm um den mittleren Durchmesser beschränkte und die Membranen die erwartete homogene Porengrößen-Verteilung aufweisen.

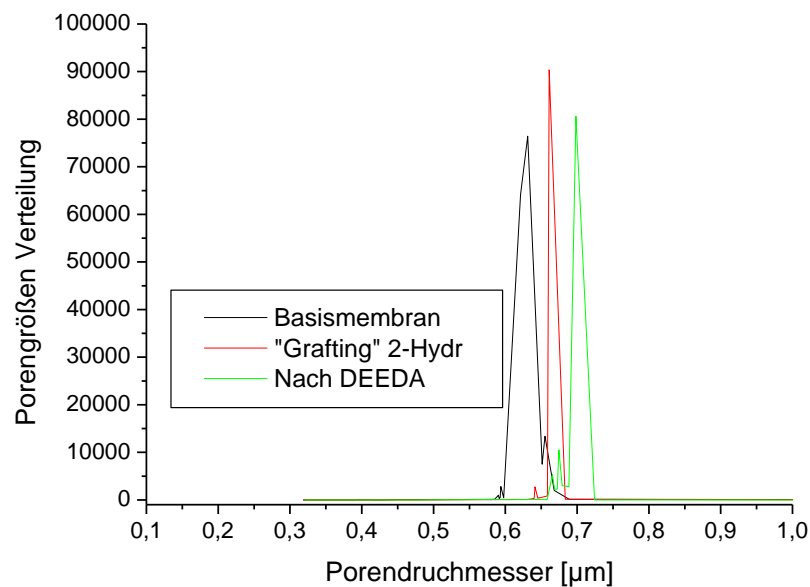


Abbildung 5.18 Porengrößen-Verteilung von verschiedenen Modifizierten Membranen.

Die Daten in Tabelle 5.3 zeigen zusätzlich Abhängigkeiten zwischen DG-Wert und Porendurchmesser. Hierbei ist Tendenziell zu erkennen, dass Membranen mit einem hohen DG-Wert geringere Porendurchmesser zeigen. Allerdings ist mit keiner Beschichtung die Verringerung des Porendurchmessers groß genug um wieder den Porendurchmesser der Basismembranen zu erreichen.

Auch zeigt sich bei den Messungen ein recht großer Fehler von ca. 20%. Dieser Fehler zeigt unabhängig von der Funktionalisierung der Membran annähernd gleiche Werte. Auch ist keine Abhängigkeit zwischen dem DG-Wert und dem Fehler zu erkennen. Da dieser schon bei den Basismembranen auftritt, ist er daher auf Inhomogenität innerhalb eines Membran Blattes zurück zu führen.

Tabelle 5.3 Ergebnisse der Permporometriemessungen für ausgewählte Membranen.

Membran	DG [$\mu\text{g} / \text{cm}^2$]	Porendurchmesser [nm]
Basis	0	631 \pm 30
Amin	0	697 \pm 47
2-Hydr	2,08	662 \pm 22
Bis	0,25	689 \pm 34
Bis/ β -Cyc	1,03	685 \pm 38
Bis/Dode	2,71	660 \pm 29
Bis/Ammo	2,56	653 \pm 35
β -Cyc	0,51	678 \pm 21
β -Cyc/Dode	0,76	681 \pm 26
β -Cyc/Ammo	0,59	688 \pm 33
Dode	2,64	642 \pm 42
Dode/Ammo	2,94	651 \pm 30
Ammo	0,11	683 \pm 25

Bei der Betrachtung der Permeabilitäten (Abb. 5.19) zeigen sich doch recht deutliche Unterschiede, die aufgrund der zuvor ermittelten Porendurchmesser nicht zu erwarten gewesen waren. Die Permeabilitätsmessungen sind wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben durchgeführt worden. Auch hierbei sind die Werte wieder aus den Messungen von jeweils drei Membranen berechnet worden. Von jeder dieser Membranen wurde die Permeabilität fünfmal bestimmt.

Dabei zeigen die Basismembranen mit dem durchschnittlich geringsten Porendurchmesser eine Permeabilität von 20500 L/h bar m². Durch die Vorfunktionalisierung mit Amin ist die Permeabilität der Membranen auf 22000 L/h bar m² gesteigert worden. Durch die Immobilisierung des Photoinitiators auf der Membranoberfläche ist die Permeabilität auf 19000 L/h bar m² abgesunken und das, obwohl die Immobilisierung des Photoinitiators nur zu einer sehr kleinen Gewichtsänderungen der Membran führt.

Die Permeabilitäten der beschichteten Membranen zeigen keine Abhängigkeiten vom DG-Wert. Membrane mit großen wie auch kleinen DG-Werten zeigen größere bzw. kleinere Permeabilitäten als die Basismembran. Entscheidender für die Permeabilität der Membranen ist die Beschichtung selbst. Hierbei zeigen die Membranen mit einer hydrophilen Beschichtung höhere Permeabilitäten als hydrophobe Beschichtungen. Besonders gut zu sehen ist dieser Effekt bei der Beschichtung mit 2-Hydr und mit Ammo. Die Membranen mit 2-Hydr als Beschichtung zeigen trotz hohem DG-Wert von 2,08 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ eine Permeabilität von 21300 L / h bar m² und diese ist fast identisch mit der Permeabilität der mit Ammo modifizierten Membranen. Deren Permeabilität ist 21700 L / h bar m² und zwar bei einem sehr geringem DG-Wert von 0,11 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. Generell zeigen alle hydrophil modifizierten

Membranen eine Permeabilität zwischen der Basismembran und der mit Amin behandelten Membran.

Der gleiche Effekt in Bezug auf den DG-Wert ist auch bei den Beschichtungen, mit einem hydrophoben Monomer zu beobachten. Zum Beispiel ist die Permeabilität, der mit Dode beschichteten Membranen (DG-Wert $2,64 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) mit $17000 \text{ L/h bar m}^2$ deutlich geringer als die der Basismembran. Allerdings ist diese Permeabilität vergleichbar mit der Permeabilität der Beschichtung β -Cyc/Dode, welche aber nur einen DG-Wert von $0,76 \mu\text{g/cm}^2$ aufweist. Auch bei den Beschichtungen mit hydrophoben Monomeren zeigt sich eine generelle Tendenz. Diese Membranen haben eine geringere Permeabilität als die Basismembranen. Als einzige Ausnahme davon präsentiert sich die Beschichtung aus Dode/Ammo.

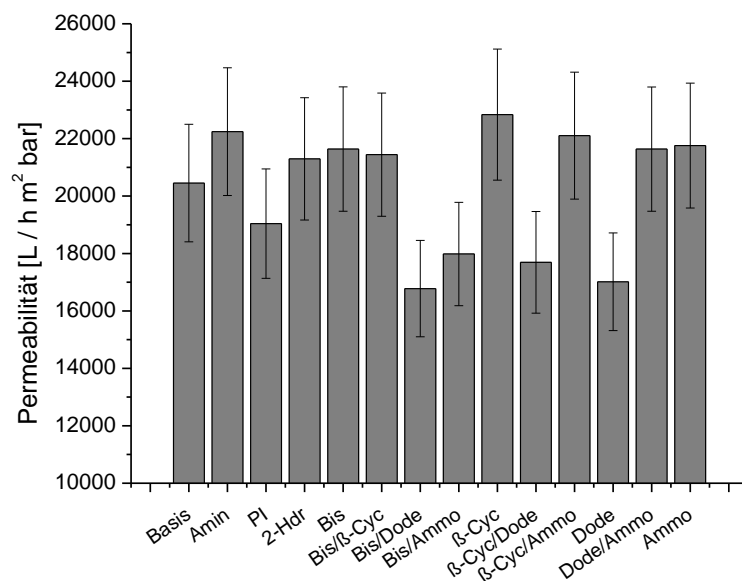


Abbildung 5.19 Ergebnisse der Permeabilitätsmessungen für die PET-Membranen

5.2.4 Variation des Pfpungsgrads mittels „Abstandhalter“-Monomer

Nachdem sich herausgestellt hat, dass die Co-Polymere in Abschnitt 5.2.2 höhere DG-Werte zeigen als die Homopolymere, sind weitere Co-Polymerisationen durchgeführt worden. Bei diesen Co-Polymerisationen sind die funktionalen Monomere mit einem „Abstandhalter“-Monomer kombiniert worden. Im ersten Schritt wurde dazu die optimale Mischung aus „Abstandhalter“- und Aminosäure selektiven Monomer bestimmt. Diese Testreihe wurde in Abbildung 5.20 aufgetragen.

Bei diesem Test ist das 2-Hydr Monomer als „Abstandhalter“ und das Bis Monomer als funktionales Monomer eingesetzt worden. Diese Mischung ist gewählt worden, um ein Monomer mit hoher und eins mit geringer Reaktivität zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen eine klare Abhängigkeit zwischen der Bis Konzentration und dem DG-

Wert. Ohne das Bis Monomer konnte wieder ein DG-Wert von ca. $2,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhalten werden. Dieser Wert ist schon bei der Zugabe von nur 10% Bis deutlich auf $0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verringert worden. Weitere Zugabe von Bis verringerte den DG-Wert weiter. Bei einem Anteil von 50% Bis ist der DG-Wert des Bis-Homopolymers wieder erreicht worden.

Daraus ergibt sich das Mischungsverhältnis für die weiteren Arbeiten. Das Verhältnis von drei Teilen „Abstandhalter“- zu einem Teil funktionalem Monomer ist dabei zu Grunde gelegt worden. Bei diesem Verhältnis zeigt die Abbildung 5.20 einen DG-Wert, der um den Faktor drei größer ist als beim Homopolymer. Auch ist die Konzentration des funktionalen Monomer hoch genug, sodass auch ein gewisser Anteil an Bis Einheiten im Polymer zu finden sein muss.

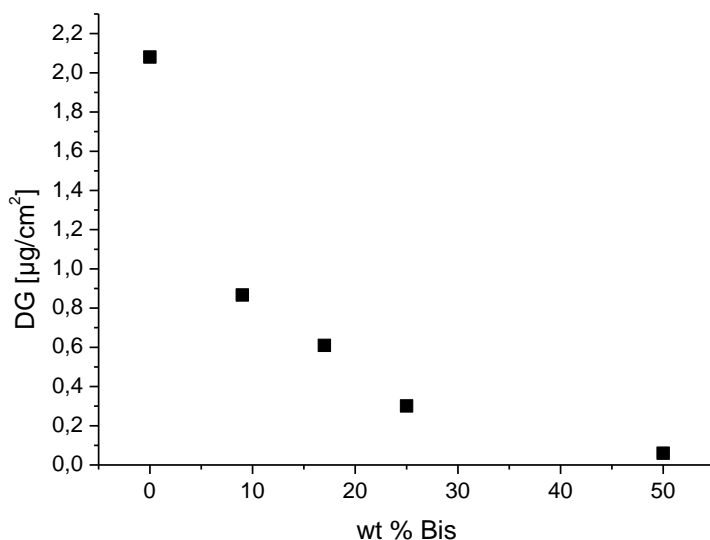


Abbildung 5.20 Variation der Monomer Konzentrationen bei einer Co-Polymerisation zwischen 2-Hydr und Bis.

Im Anschluss an die Tests mit 2-Hydr/Bis sind die Pfropf-Polymerisationen mit „Abstandhalter“ für die anderen funktionalen Monomere durchgeführt und mit den Ergebnissen der Homopolymerisation verglichen worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.21 aufgetragen. Für die Polymerisationen sind die Membranen genau wie bei den Polymerisationen ohne „Abstandhalter“ (Abschnitt 5.2.1) vorbereitet worden. Die Mischungen der Monomere betragen 3/1 bzw. 3/1/1 Massenanteile. Auch hierfür sind wieder mindestens drei Membranen mit der gleichen Beschichtung versehen worden und der durchschnittliche DG-Wert ist aus den einzelnen Messungen bestimmt worden.

Aus den Daten in Abbildung 5.21 zeigt sich, dass die Polymerisationen mit „Abstandhalter“ bei allen Messungen zu einer Erhöhung des DG-Werts führen. Diese Erhöhung war besonders bei den Polymeren mit „Abstandhalter“ und einem geladenen Monomeren sehr

ausgeprägt. Hierbei zeigt sich eine Erhöhung des DG-Wert für 2-Hydr/Bis, wie oben bereits erwähnt um den Faktor drei und für 2-Hydr/Ammo sogar um den Faktor acht.

Für die anderen Kombinationen aus funktionalem Monomer und „Abstandhalter“ sind nur moderate Erhöhungen zu beobachten gewesen. Die geringste Erhöhung zeigen dabei die Co-Polymere aus 2-Hydr/Bis/Dode, 2-Hydr/Bis/Ammo und 2-Hydr/Dode. Für diese Co-Polymere sind Erhöhungen von unter 5% erhalten worden. Die weiteren Mischungen zeigen größere Erhöhungen zwischen 20% und 30%. Die Abweichungen dieser Messungen sind hier in selben Bereich wie bei den Polymerisationen ohne „Abstandhalter“ gewesen (18%-20%).

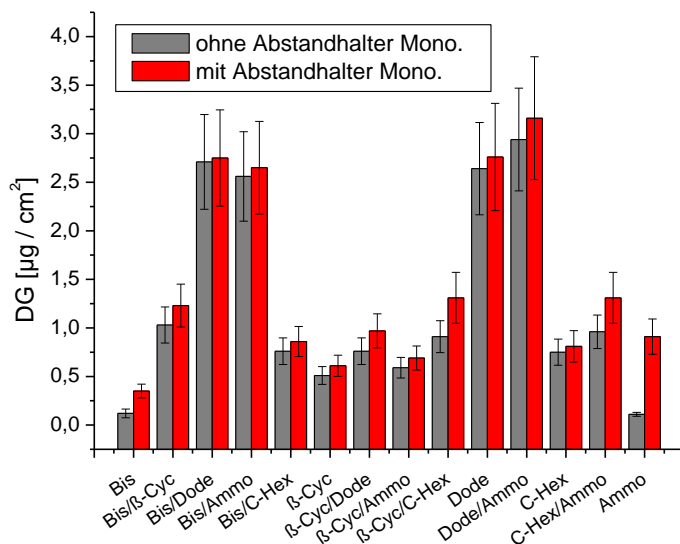


Abbildung 5.21 Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen mit und ohne „Abstandhalter“. Als „Abstandhalter“ wurde 2-Hydr im Verhältnis 3/1 bzw. 3/1/1 eingesetzt.

Im Verlauf dieser Testreihe sind von der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader noch weitere Monomere zur Verfügung gestellt worden. Die Pfropf-Polymerisation dieser Monomere ist nur als Co-Polymerisation, mit 2-Hydr als „Abstandhalter“-Monomer durchgeführt worden. Die Polymerisationen sind wieder wie zuvor beschrieben durchgeführt, und der DG-Wert ist aus mindestens drei Membranen berechnet worden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Abbildung 5.22.

Die Daten zeigen dabei, dass der DG-Wert abhängig vom eingesetzten Monomer bzw. der Monomermischung ist. Dabei zeigen die Polymere aus NTA, Bzamidin und die Mischungen Bzamidin/Bis, B(OH)2/Bis recht kleine DG-Werte bis maximal 0,55 µg/cm². Die Mischungen aus B(OH)2, B(OH)2/Ammo und B(OH)2/C-Hex zeigen hingegen größere DG-Werte von 1,5 - 1,8 µg/cm². Generell sind die DG-Werte der Mischungen mit B(OH)2 etwas größer als die der Mischungen mit Bzamidin. Beim Fehler verhielten sich die Reaktionslösungen genau wie die zuvor beschriebenen. Der Fehler liegt bei ca. 20% des DG-Werts.

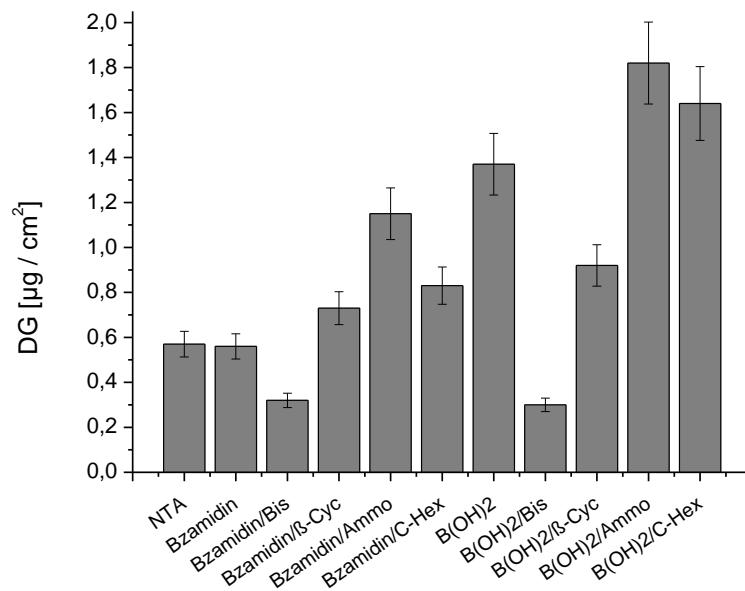


Abbildung 5.22 Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen mit weiteren Aminosäure selektiven Monomeren. Alle Polymere wurden mit 2-Hydr als „Abstandhalter“ in Verhältnis 3/1 bzw. 3/1/1 durchgeführt.

5.3 Pfropfung von Cellulose-Membranen

Auch bei den Cellulose-Membranen sind die spezifische Oberfläche, die Permeabilität, die Porengröße und der Kontaktwinkel bestimmt worden. Außerdem sind REM-Aufnahmen von den Membranen angefertigt worden. Eine REM-Aufnahme der Basismembran ist in Abbildung 5.23 dargestellt.

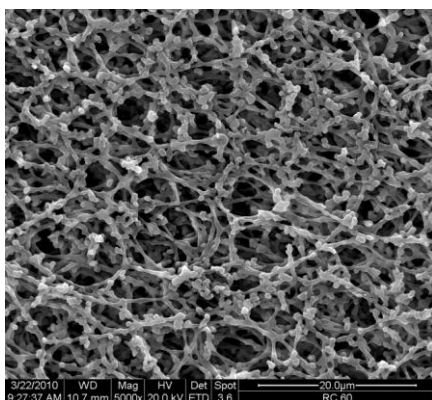


Abbildung 5.23 REM-Aufnahme einer Cellulose Basismembran.

Die Bestimmungen sind wie in Abschnitt 4.4 beschrieben erfolgt. Dabei ist die spezifische Oberfläche wieder mittels BET-Analyse (Abschnitt 4.4.5) bestimmt worden. Für die spezifische Oberfläche der Cellulose-Membranen ist ein Wert von 6,18 m²/g gefunden worden. Dieser Wert war deutlich größer als die Oberfläche der PET-Membranen. Auch bei

den Cellulose-Membranen ist die spezifische Oberfläche, wie bei den PET-Membranen, für die Berechnung des DG-Werts nach Formel (2) verwendet worden. Die Bestimmung der Porengröße ist in Abschnitt 4.4.4 beschrieben und ist jeweils mit 3 Membranen gleicher Beschichtung durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Messungen (Abbildung 5.24) zeigen, dass die Porengröße mit $1,35\text{ }\mu\text{m}$ etwas größer ist als die von Hersteller angegebene ($1\text{ }\mu\text{m}$).

Auch zeigte sich, dass durch Pfropfen der Membran, in diesem Fall mit 2-Hydr, die durchschnittliche Porengröße nicht sichtbar verändert werden konnte. Allerdings ist es zu einer Verbreiterung der Porengrößenverteilung gekommen. Der Fehler dieser Messungen ist etwa 60 nm . Von den vermessenen Proben sind alle in diesem Bereich gewesen. Daher ist diese Methode nicht geeignet um die Beschichtungen zu charakterisieren, da auf Grund der großen Poren in den Cellulose-Membranen keine Änderungen sichtbar sind.

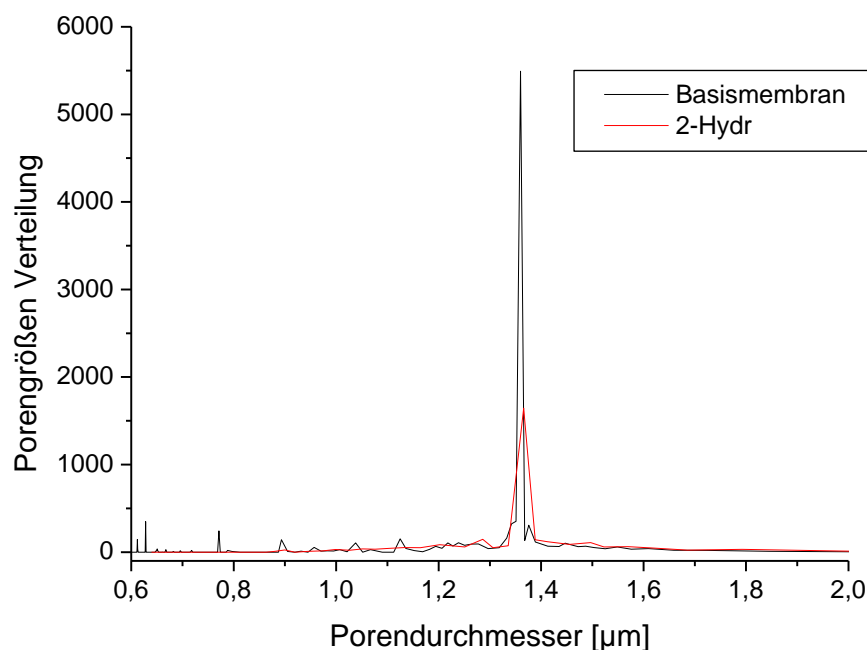


Abbildung 5.24 Porengrößen-Verteilung der RC-60 Basismembran und der 2-Hydr Membranen (DG-Wert $1,78\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Weiterhin ist der Kontaktwinkel wie in Abschnitt 4.4.3 bestimmt worden. Bei diesen Messungen zeigt sich, dass die Membranen einen stark hydrophilen Charakter haben. Aufgrund dieses Charakters und der großen Poren ist es nicht möglich gewesen, einen Wert für den Kontaktwinkel zu bestimmen. Bei den Messungen ist der Tropfen bereits nach etwa einer Sekunde von der Membran absorbiert worden.

Bei der Permeabilität, die wie in Abschnitt 4.4.2 bestimmt worden ist, ist auch kein Einfluss der Beschichtung zu beobachten gewesen. Die Basismembran zeigt eine Permeabilität von 88000 L/h m² bar. Die Permeabilität aller beschichteten Membranen weicht von diesem Wert maximal 7% ab. Die Abweichung innerhalb der Basismembranen beträgt aber selbst schon 5%. Daher können mit dieser Methode keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Beschichtung gezogen werden.

5.3.1 Pfropfungsgrad

Auf den Cellulose-Membranen sind die Pfropf-Polymerisationen direkt mit einem „Abstandhalter“-Monomer durchgeführt worden. Der Grund dafür sind die höheren DG-Werte, die bei den Messungen auf PET-Membranen erreicht worden sind. Gleichzeitig ist der Verbrauch an selbst hergestellten Monomeren dadurch reduziert worden. Für die Pfropf-Polymerisationen sind die Membranen nach Methode zwei (Abschnitt 4.2.1) mit Photoinitiator versehen worden. Die ersten Pfropf-Polymerisationen sind wieder, wie bei den PET-Membranen, mit den verschiedenen Monomermischungen aus 2-Hydr und Bis durchgeführt worden.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.25 aufgetragen. Hierbei zeigen sich, bei den Konzentrationen 17%, 25% und 50% Bis gleiche DG-Werte wie bei den PET-Membranen. Für einen Anteil von 9% Bis ist ein DG-Wert von 1,1 µg/cm² erhalten worden. Dieser Wert ist etwas höher als der DG-Wert bei den PET-Membranen. Beim Pfropfen mit reinem 2-Hydr ist der DG-Wert mit 1,75 µg/cm² aber etwas kleiner als bei den PET-Membranen. Da bei dem bisher verwendeten Verhältnis von 3/1 die Ergebnisse von PET und Cellulose-Membranen übereinstimmen, sind auch die weiteren Pfropfungen mit diesem Verhältnis durchgeführt worden. Bei der Abweichung der DG-Werte über mindestens drei Messungen zeigen Cellulose-Membrane mit ca. 20% gleiche Werte wie die PET-Membranen.

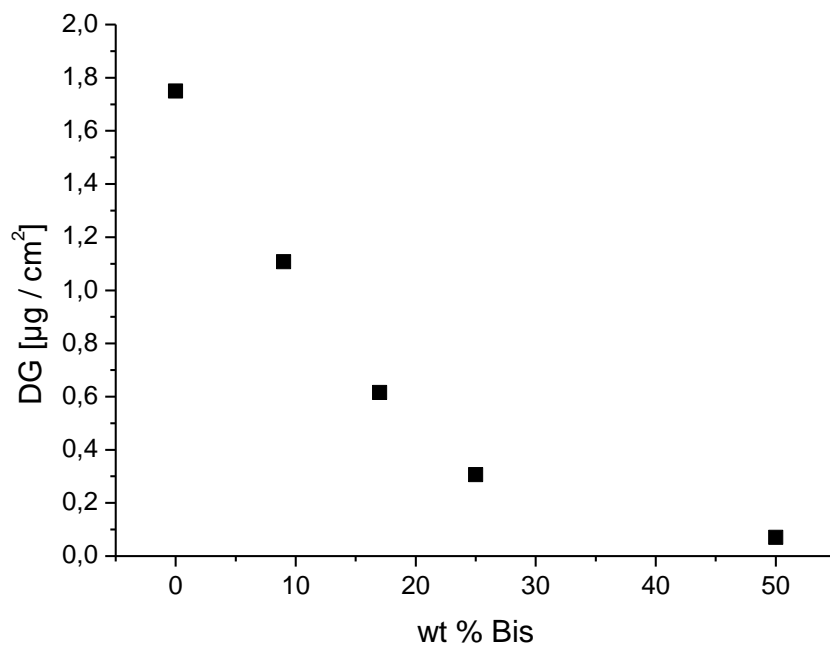


Abbildung 5.25 Variation der Verhältnisse von 2-Hydr und Bis auf Cellulose (RC 60).

Im Anschluss an die Tests mit 2-Hydr/Bis sind Pfropf-Polymerisationen mit dem „Abstandhalter“ (2-Hydr) und den funktionalen Monomeren auf den Cellulose-Membranen durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 5.26 aufgetragen. Für die Polymerisationen sind die Membranen wieder nach Methode zwei (Abschnitt 4.2.1) mit Photoinitiator versehen worden. Die Massenanteile der Monomermischungen sind auf drei Teile Abstandhalter und jeweils ein Teil funktional Monomer, also 3/1 bzw. 3/1/1 Massenanteile eingestellt worden. Auch bei diesen Pfropf-Polymerisationen sind wieder mindestens drei Membranen mit der gleichen Beschichtung versehen worden, und der durchschnittliche DG-Wert ist aus den einzelnen Messungen bestimmt worden.

Diese Membranen zeigen geringe DG-Werte für die Beschichtungen bei dem das geladene Monomer Bis verwendet worden ist. Die Membranen, die mit Bis, Bis/ β -Cyc, Bis/Dode und Bis/C-Hex funktionalisiert worden sind, zeigen einen maximalen DG-Wert von $0,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Als Ausnahme von dieser Tendenz zeigt sich die Beschichtung mit Bis/Ammo. Mit dieser Mischung konnte ein DG-Wert von $0,98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht werden. Bei den meisten Mischungen, in denen β -Cyc als Monomer enthalten ist, sind vergleichsweise hohe DG-Werte erhalten worden. Die Mischung β -Cyc und β -Cyc/Dode ergaben DG-Werte von ca. $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und die Mischungen β -Cyc/Ammo und β -Cyc/C-Hex ergaben DG-Werte von ca. $0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Im Gegensatz dazu zeigen alle Mischungen mit den monomeren Bzamidin und B(OH)₂ geringe DG-Werte. Maximal konnte mit diesen Mischungen ein Wert von $0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht werden. Durchschnittlich haben diese Membranen aber einen DG-Wert von ca. $0,25$

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ebenfalls einen geringen DG-Wert weisen die Mischungen mit dem Monomer Dode ($0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), dem Monomer C-Hex ($0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und dem Monomer NTA ($0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf. Das Monomer Ammo allein zeigt einen hohen DG-Wert von $2,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, aber die Mischungen mit diesem Monomer führen zu geringeren DG-Werten.

Gleiche Ergebnisse für Cellulose und PET-Membranen sind mit den Montermischungen Bis, β -Cyc / Ammo, β -Cyc / C-Hex, B(OH)₂ / Bis gefunden worden. Tendenziell zeigt sich, dass bei Beschichtungen mit hydrophilen Monomeren der DG-Wert der Cellulose-Membranen größer ist als bei den PET-Membranen. Beispiele hierfür sind die Pfropfungen mit β -Cyc, β -Cyc / Dode, Ammo und NTA. Für die anderen Mischungen zeigen die PET-Membranen größere DG-Werte. Diese Mischungen weisen häufig einen Anteil an hydrophoben Monomeren auf. Ausnahme davon sind die Mischungen aus Bis / β -Cyc und Bis / Ammo. Der Fehler der Pfropf-Polymerisationen ist in der Abbildung nicht angegeben, ist aber wieder um 20% gewesen.

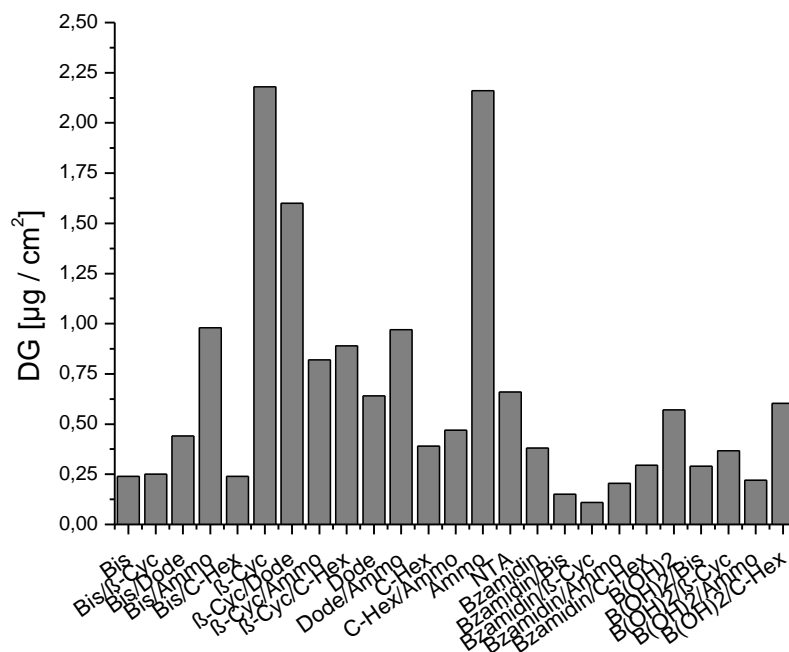


Abbildung 5.26 Ergebnisse der Pfropfung Cellulose-Membranen. Co-Polymere aus 2-Hydr plus dem Angegebenen Monomer(en). Verhältnis wt 3/1 bzw. 3/1/1.

Im weiten Verlauf der Arbeiten mit den funktionalen Monomeren sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Schrader die „besten Adsorber“ Polymere mittels ELISA-Test ermittelt worden. Bei diesen Polymeren handelte es sich um Lösungspolymere, welche sich aus den Monomeren 3 Bis / β -Cyc / GAMA bzw. 3 Bis / NTA / GAMA zusammensetzen. Diese Arbeiten sind von der Frau Latza während ihrer Promotion durchgeführt worden.

Diese Polymere sind als Vorbild für die Pfropf-Polymerisationen verwendet worden. Bei diesen Pfropf-Polymerisationen sind aber anstatt nur 3 Bis/ β -Cyc/GAMA bzw. 3 Bis/NTA/GAMA noch weitere Mischungen verwendet worden. Bei diesen Mischungen ist das Verhältnis von 3 Bis/ β -Cyc bzw. 3 Bis/NTA beibehalten worden, aber zum einen sind die Monomere GAMA und 2-Hydr als Abstandhalter verwendet worden und zum anderen sind die Menge an GAMA und 2-Hydr variiert worden. Durch diese Variation sind insgesamt acht Monomer-Kombinationen erhalten worden.

Die Ergebnisse dieser Pfropf-Polymerisationen sind in Abbildung 5.27 dargestellt. Alle Monomerkombinationen zeigen dabei ähnlich geringe DG-Werte. Die Werte liegen bei den meisten Kombinationen im Bereich von $0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nur für die Kombinationen aus 3 Bis/1 β -Cyc/1 2-Hydr, 3 Bis/1 NTA/ 1 2-Hydr und 3 Bis/1 NTA/6 GAMA liegen die Werte um $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die gesamte Abweichung zwischen dem kleinsten und dem größten DG-Werten ist dabei nur etwa doppelt so groß wie der berechnete Fehler. Die Abweichung zwischen dem größten und dem kleinsten DG-Wert beträgt 40% und der Fehler beträgt wieder 20%.

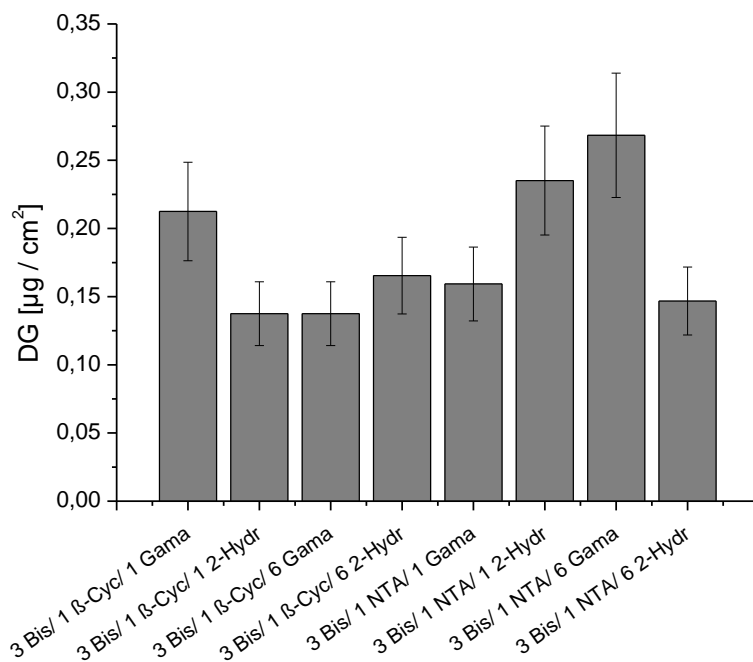


Abbildung 5.27 DG-Werte der „besten Adsorber“.

Als Ergänzung und zum Vergleich sind noch Cellulose-Membranen mit den konventionellen Ionenaustauschern 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (AMPS), Vinylsulfonsäure (VS), Vinylphosphonsäure (VP) modifiziert worden. Diese Modifizierungen wurden auch wieder als Co-Polymerisationen mit 2-Hydr durchgeführt. Als Ergebnis sind DG-Werte von durchschnittlich $1,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für AMPS, $1,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für VS und $0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für VP mit einer Abweichung von 10% über drei Membranen erhalten worden.

5.3.2 Variation der Photoinitiatordichte

Die Variation der Photoinitiatordichte ist wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben durchgeführt worden. Zur Variation der Dichte ist der Photoinitiator mit Benzoesäure bzw. Benzoesäurebromid verdünnt worden. Nach der Immobilisierung sind die Einflüsse der Photoinitiator Variation sowohl „qualitativ“ wie auch quantitativ bestimmt worden. Die Variationen der Photoinitiatordichte sind dabei mit Methode 2 und 3 durchgeführt worden.

Bei der „qualitativen“ Bestimmung der Photoinitiatordichte sind die Cellulose-Membranen jeweils mit 2-Hyd/Bis (3/1) funktionalisiert. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind in Abbildung 5.28 aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass die DG-Werte der beiden Methoden sehr gut übereinstimmen. Außerdem zeigt sich ein Anstieg des DG-Werts bis zu einem Photoinitiatoranteil von 80%. Bei einem Photoinitiatoranteil von 10% und 100% sind die DG-Werte annähernd gleich. Die Abweichungen zwischen den beiden Methoden liegen hierbei im Bereich des Fehlers. Der Fehler betrug dabei in Durchschnitt 19%. Allerdings ist der Fehler, bei einem Photoinitiatoranteil von 50% in Kombination mit Methode zwei deutlich größer. Die Abweichung der DG-Werte liegt hierbei bei 78%.

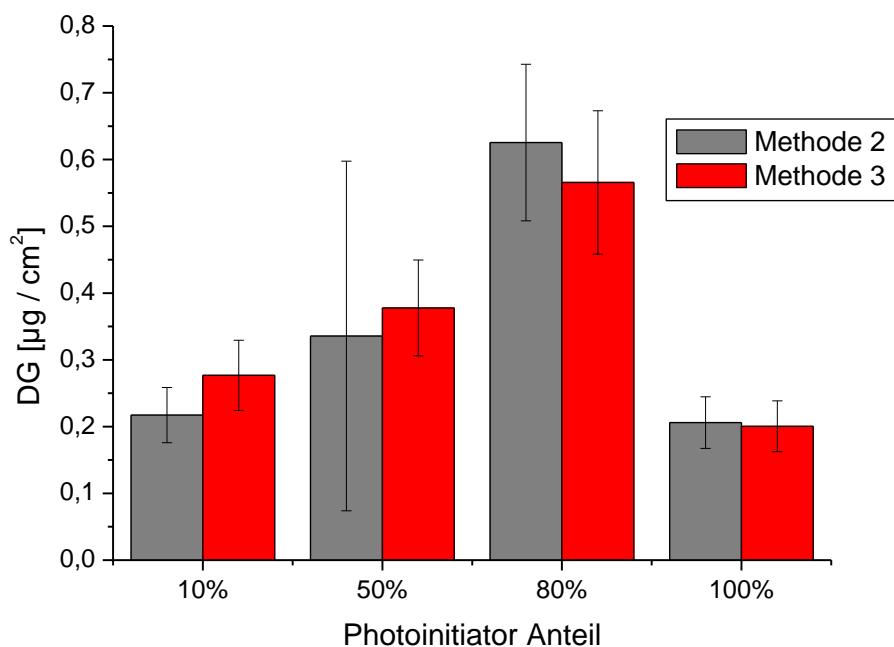


Abbildung 5.28 Vergleich der Immobilisierungsmethoden zwei und drei bei unterschiedlichen Photoinitiator Dichten.

Die quantitative Bestimmung der Photoinitiatordichte ist mittels saurer Ersterspaltung und anschließender HPLC Analyse durchgeführt worden. Dabei sind auf Cellulose Membranen nach Methode drei (Abschnitt 4.2.1) Photoinitiator bzw. Photoinitiator und Benzoesäurebromid immobilisiert worden. Im Anschluss an die Immobilisierung ist der

Photoinitiator und die Benzoessäure, wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, sauer von der Oberfläche abgespalten (Abbildung 4.9) und mittels HPLC analysiert worden. Ein HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 5.29 aufgetragen. Dieses Chromatogramm zeigt, dass der Peak für den Photoinitiator klar vom Benzoessäure Peak getrennt ist. Allerdings läuft der Benzoessäure Peak in den Peak für das Lösungsmittel und ist dadurch mit einem recht großen Fehler behaftet.

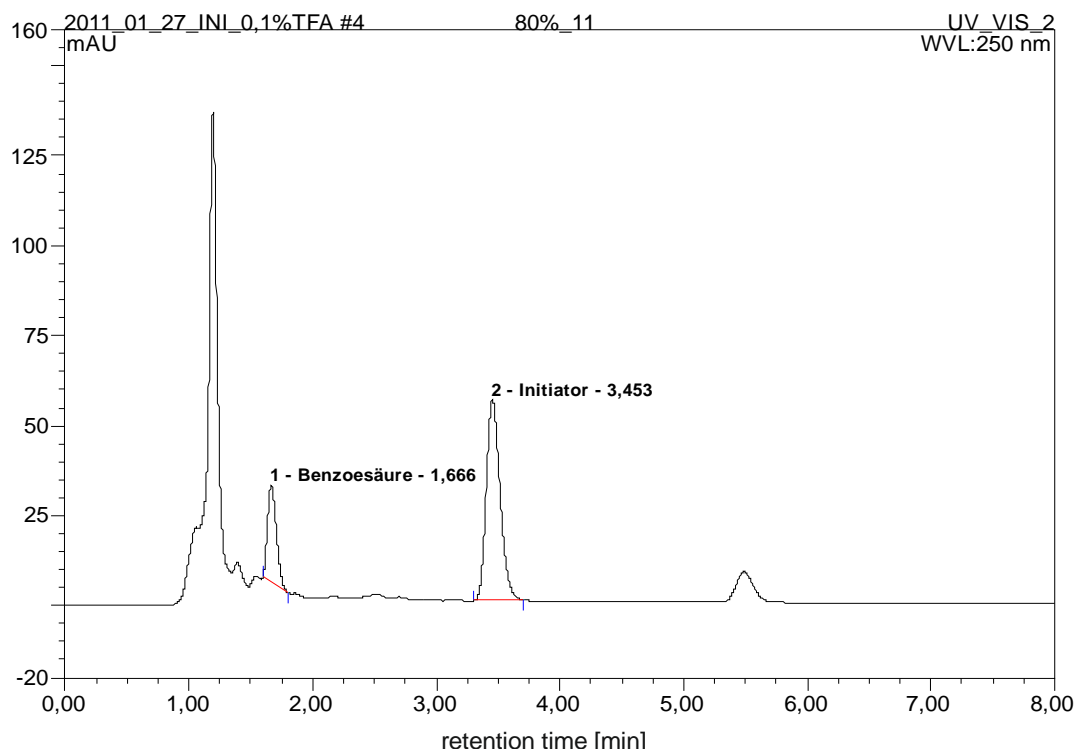


Abbildung 5.29 HPCL-Chromatogramm von Photoinitiator und Benzoessäure, die von der Membran gelöst wurden.

Die Ergebnisse der HPLC-Messungen werden in Abbildung 5.30 dargestellt. In dieser Abbildung sind die ermittelten Konzentrationen des Photoinitiators und der Benzoessäure aufgetragen. Der Anteil an gebundenem Photoinitiator steigt bis zu einem Photoinitiatoranteil von 80%. Danach fällt der Wert wieder ab. Für die Photoinitiatordichte zeigt sich, dass bei einem Anteil von 10% und 100% Photoinitiator annähernd dieselben Werte von 50 pmol/cm² erreicht worden sind, bei 50% Photoinitiatoranteil ist der Wert auf 100 pmol/cm² angestiegen und bei einem Anteil von 80% Photoinitiator steigt der Wert weiter bis auf 380 pmol/cm² an. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Photoinitiatordichte zeigen damit dieselben Tendenzen wie die „qualitative“ Bestimmung. Die Abweichung der Photoinitiatordichten beträgt 10% über die einzelnen Messungen. Jede Dichte ist dabei von drei Membranen bestimmt worden.

Die Benzoessäuredichte auf der Oberfläche zeigt einen erwarteten Verlauf. Die höchste Benzoessäuredichte ist bei einem Photoinitiatoranteil von 10%, also einem Benzoessäure-

anteil von 90% zu finden. Die Dichte liegt hierbei bei etwa 1000 pmol/cm². Die Benzoessäuredichte zeigt einen annähernd linearen Abfall über die einzelnen Stufen. Bei einem Anteil von 50% beträgt die Dichte noch 380 pmol/cm², bei 80% Photoinitiatoranteil bzw. 20% Benzoessäureanteil beträgt der Wert noch 135 pmol/cm². Auch bei einem Photoinitiatoranteil von 100% ist noch Benzoessäure detektiert worden. Die gefundene Benzoessäuredichte ist hierbei noch ca. 70 pmol/cm². Dieser Wert zeigt, dass die Messung der Benzoessäuredichte mit einem recht hohen Fehler behaftet ist. Der Fehler dieser Messung ist abhängig vom Benzoessäureanteil. Für die Messungen bei 90% Benzoessäureanteil beträgt er 41%, bei 50% beträgt er 53%, bei 20% Benzoessäureanteil liegt der Fehler bei 87% und den Membranen mit 100% Photoinitiatoranteil liegt der Fehler bei 120%.

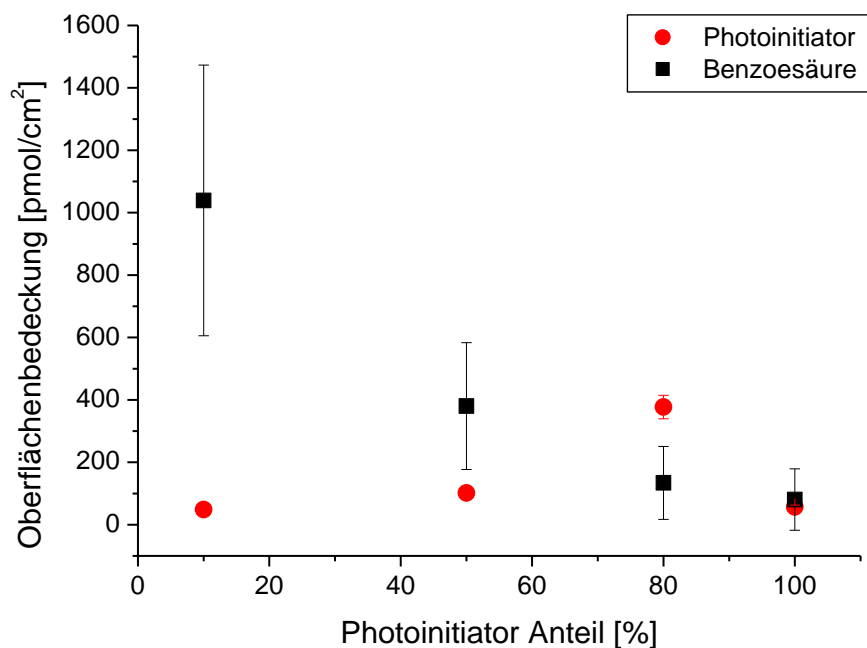


Abbildung 5.30 Dichten von Photoinitiator und Benzoessäure auf der Cellulose-Oberfläche, bestimmt mittels Ester-Spaltung und HPLC.

In Anschluss an die quantitativen Messungen sind nochmals qualitative Messungen durchgeführt worden. Bei diesen Messungen ist auf jeweils drei Membranen eine Photoinitiatordichte nach Methode drei immobilisiert worden. Im Anschluss sind die Membranen mit unterschiedlichen Monomermischungen beschichtet worden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.31 aufgetragen und zeigen denselben Verlauf wie er bereits bei den anderen Messungen festgestellt worden ist. Besonders ausgeprägt zeigt sich der Einfluss der Photoinitiatordichte bei den Membranen, die mit 2-Hydr, Bis/β-Cyc/2-Hydr, Bis/Dode/2-Hydr, und C-Hex/2-Hydr funktionalisiert worden sind. Bei diesen Membranen ist

wieder der Anstieg des DG-Werts bis zu einem Photoinitiatoranteil von 80% zu erkennen. Auch sind bei diesen Messungen die DG-Werte bei 10% und 100% Photoinitiatoranteil annähernd identisch. Für die anderen beiden getesteten Beschichtungen ist diese Tendenz zwar auch zu sehen, aber nicht so ausgeprägt wie bei den zuvor genannten Mischungen. Die Abweichung der DG-Werte beträgt bei diesen Messungen zwischen 20% und 22,5%.

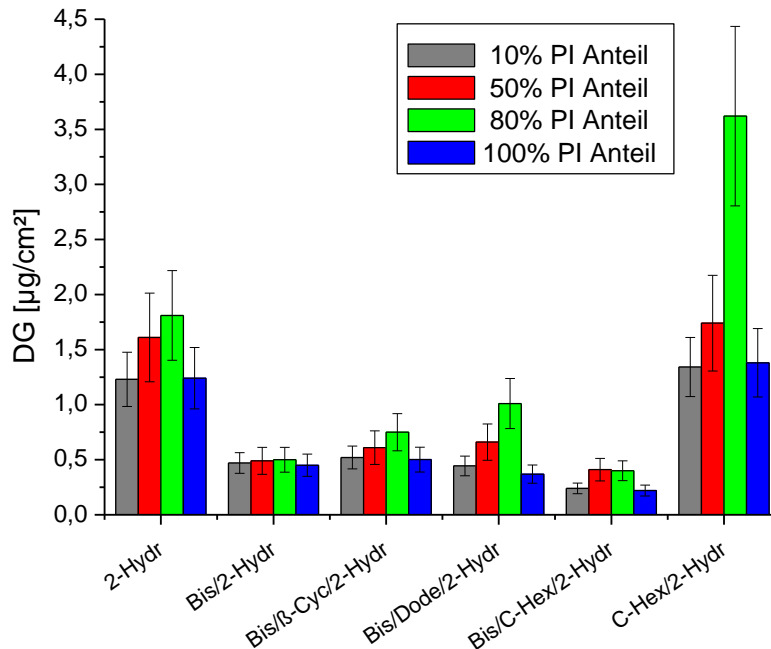


Abbildung 5.31 Pfropf-Polymerisation mit verschiedenen Photoinitiator Dichten und verschiedenen Montermischungen.

5.3.3 Pfropfdichten

Die Bestimmung der Pfropfdichte ist mittels basischer Ersterspaltung und anschließender GPC-Analyse durchgeführt worden. Dabei ist der Photoinitiator nach Methode drei (Abschnitt 4.2.1) auf Cellulose-Membranen immobilisiert worden. Im Anschluss an die Immobilisierung ist eine Pfropf-Polymerisation mit dem Monomer 2-Hydr (Abschnitt 4.3) durchgeführt worden. Das gepfropfte Polymer ist im Anschluss, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, basisch von der Oberfläche abgespalten worden (Abbildung 4.10). Nach der Abspaltung ist das Polymer aufgereinigt und mittels GPC analysiert worden.

Ein GP-Chromatogramm ist in Abbildung 5.32 aufgetragen und zeigt die verschiedenen Peaks. Die Peaks innerhalb der Markierung zwischen 13 ml und 22 ml Elutions-Volumen sind dabei die Polymerpeaks. Die weiten Peaks von 24 ml bis 33 ml Elutionsvolumen sind dem HEPES-Puffer und dem Laufmittel zuzuschreiben.

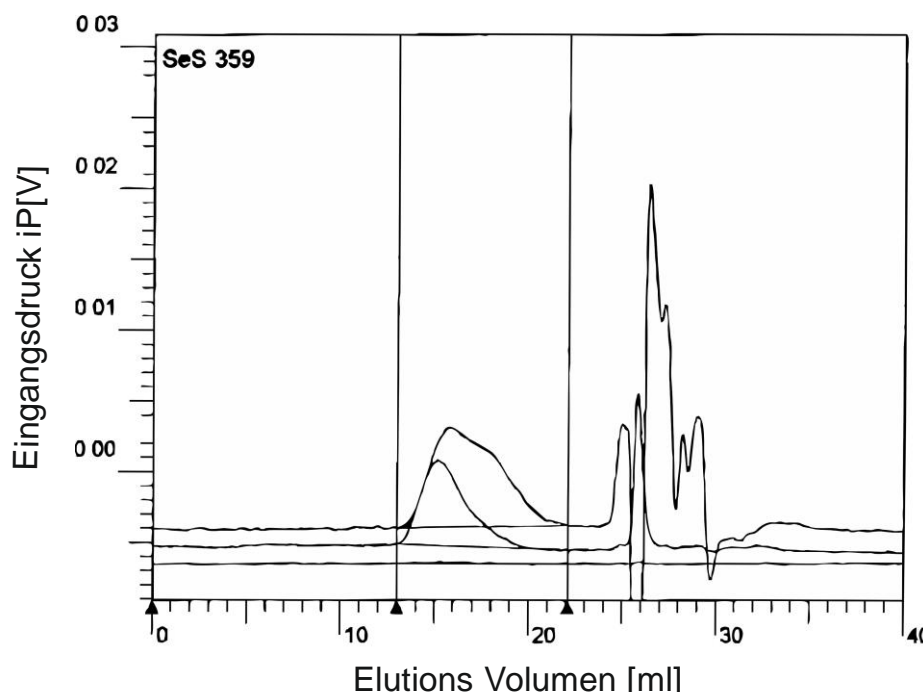


Abbildung 5.32 GP-Chromatogramm der Polymerbestimmung

Die Ergebnisse der GPC-Messungen sind in Tabelle 5.4 aufgetragen. Diese Tabelle vergleicht die Photoinitiatordichte, den DG-Wert, das Molekulargewicht der Polymere und die daraus resultierenden Pfropfdichten. Der Verlauf des DG-Werts ist auch bei diesen Messungen vergleichbar mit dem in Abbildung 5.28 gezeigten Verlauf. Auch entsprechen die Photoinitiatordichten denen aus dem Abschnitt 5.3.2.

Die Molekulargewichte der Polymere zeigen hierbei eine Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte. Allerdings zeigt sich ein umgekehrter Trend wie beim DG-Werten. Bei einer kleinen Photoinitiatordichte sind recht große Molmassen von 320-350 kg/mol erhalten worden (siehe 2-Hydr_10% und 2-Hydr_100%). Diese Molmassen nehmen ab wenn die Photoinitiatordichte größer wird. Bei 2-Hydr_50% ist eine Molmasse von 275 kg/mol erhalten worden und bei 2-Hydr_80% eine mit knapp 100 kg/mol. Dabei sind die Molmassenbestimmung aus zwei Messungen mit jeweils drei Membranen durchgeführt worden. Die Abweichungen der Messwerte betragen zwischen 14 % und 17%.

Die Pfropfdichte sind dann aus dem DG-Wert und der Molmasse der Polymere berechnet worden. Die berechneten Pfropfdichten sind dabei sowohl in Tabelle 5.4 aufgetragen, als auch in Abbildung 5.33. Die Abbildung 5.33 vergleicht den Verlauf der Photoinitiatordichten mit dem Verlauf der Pfropfdichten. Dabei zeigt sich bei den Pfropfdichten derselbe Verlauf wie bei den Photoinitiatordichten.

Tabelle 5.4 “Pfropfungsgrad” und Molekulargewicht der Pfropf-Polymere, ermittelt durch basische Ester-Spaltung und GPC.

Probe	PI-Dichte [pmol / cm ²]	DG [μg/cm ²]	Molekular- gewicht [g /mol]	Pfropfdichte [pmol/cm ²]
2-Hydr_10%	48	1,13	3,18E+05	44
2-Hydr_50%	102	1,66	2,76E+05	68
2-Hydr_80%	377	1,78	9,75E+04	115
2-Hydr_100%	57	1,30	3,53E+05	48

Auch hierbei wurde die größte Pfropfdichte bei einem Photoinitiatoranteil von 80% erhalten. Die Pfropfdichten für 10% und 100% Photoinitiatoranteil zeigen ähnliche Werte und die Pfropfdichte bei 50% Photoinitiatoranteil liegen zwischen der von 10% und 80% Photoinitiatoranteil. Als weiterer Trend zeigt sich auch, dass die Abweichung zwischen Photoinitiatordichte und Pfropfdichte bei ansteigender Pfropfdichte größer geworden ist. So zeigen die kleinen Pfropfdichten bei 10% bzw. 100% Photoinitiatoranteil eine ca. 90 % Übereinstimmung mit den Photoinitiatordichten. Bei einem Photoinitiatoranteil von 50% beträgt diese Übereinstimmung dann nur noch 67% und bei 80% Photoinitiatoranteil sinkt die Übereinstimmung zwischen Photoinitiatordichte und Pfropfdichte auf 30%. Die Abweichung der Pfropfdichte der einzelnen Messungen ist abhängig vom Fehler des DG-Wert und der Molmasse. Durch diesen Einfluss ist ein Fehler von ca. 30% bei der Ermittlung der Pfropfdichten erhalten worden.

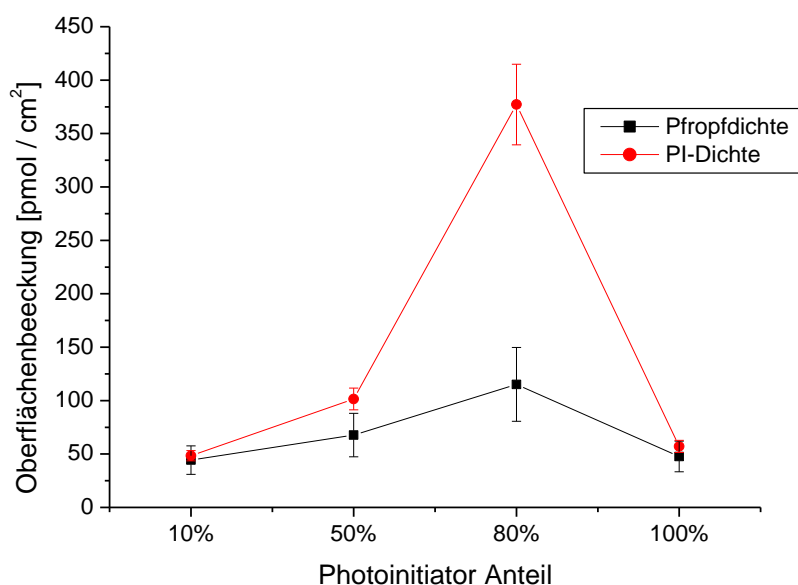


Abbildung 5.33 Vergleich der Pfropfdichten mit den Photoinitiator Dichten

5.3.4 Pfropf-Copolymer Zusammensetzung

Bei der Bestimmung der Pfropf-Copolymer Zusammensetzung sind zuerst die relativen Reaktivitäten der Monomermischungen bestimmt worden. Dazu ist das Monomer 2-Hydr als Referenz verwendet worden und dessen Reaktivität als 100% definiert worden. Die Reaktivität der weiteren Monomermischungen ist dann im Bezug auf das 2-Hydr Monomer berechnet worden. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abbildung 5.34 aufgetragen. Es zeigt sich, dass keine Monomermischung die gleiche Reaktivität wie 2-Hydr hat. Allerdings zeigt eine Mischung eine höhere relative Reaktivität. Diese Mischung besteht aus 2-Hydr/C-Hex. Die Reaktivität dieser Mischung beträgt 375% der Reaktivität von 2-Hydr allein. Für die anderen getesteten Mischungen sind geringere Reaktivitäten gefunden worden. Die geringste zeigt dabei die Mischung aus 2-Hydr/Bis. Diese Mischung hat nur 17% der Reaktivität von 2-Hydr.

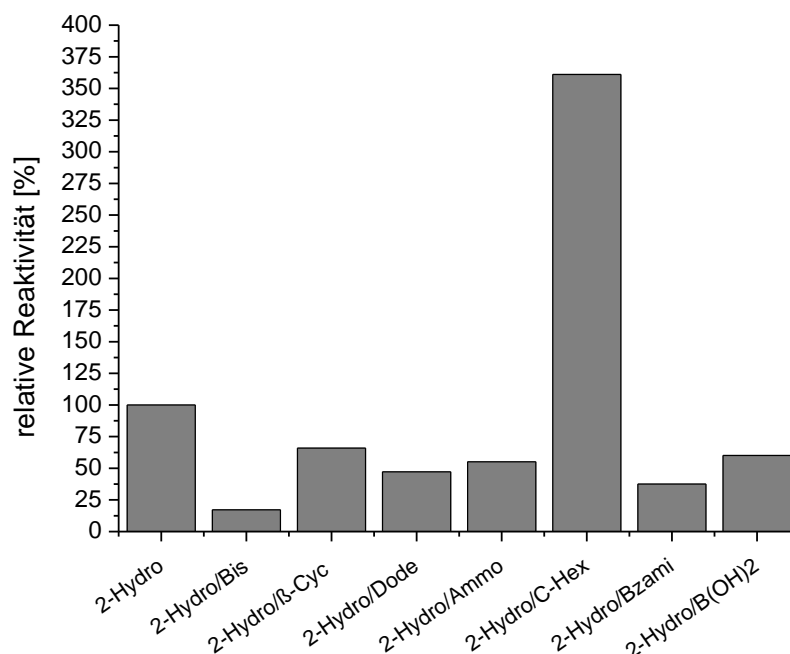


Abbildung 5.34 Relative Reaktivitäten der Monomermischungen.

Um die genauen Zusammensetzungen der Polymere zu bestimmen, sind ^1H -NMR Analysen der Polymere durchgeführt worden (Abschnitt 4.6). Für die Binären Mischungen ist meistens ein Monomerverhältnis von 1:1 verwendet worden. Dieses Verhältnis ist bei den ternären Mischungen variiert worden. Die Ergebnisse der NMR Messungen sind in Tabelle 5.5 aufgetragen. Die Analysierten Membranen haben dazu alle einen DG von $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gezeigt, das ist der maximalen DG einiger Monomer Mischungen. Dabei sind nur niedrige Umsätze von ca. 1% erreicht worden.

Generell ist eine starke Abhängigkeit der Copolymer-Zusammensetzung von den eingesetzten funktionalen Monomeren beobachtet. Diese Abhängigkeit ist auf die relativen Reaktivitäten der Monomere (Abbildung 5.34) zurück zu führen. Als Referenzsystem ist eine Mischung aus Acrylsäure und Acrylamid verwendet worden. Diese Monomere haben schon in früheren Studien ähnliche relative Reaktivitäten bei Pfropf-Copolymerisationen aus wässrigen Lösungen gezeigt.^[84] Das vorhergesagte Verhältnis dieser Monomere sollte nach der Reaktion auch wieder 1:1 betragen. Dieses Verhältnis ist auch gefunden worden.

Die anderen Resultate zeigen, dass das geladen Bis Monomer eine geringe Reaktivität aufweist. Dieser geringe Einbau des Bis-Monomers ist sowohl bei den getesteten binären Mischungen als auch bei den ternären Mischungen zu beobachten. Auch die Resultate des relativ großen β -Cyc-Monomers zeigen eine geringe Reaktivität. Im Vergleich dazu zeigt das Dode-Monomer eine deutlich größere Reaktivität, die im Bereich der „Abstandhalter“-Monomere liegt. Der Vergleich der „Abstandhalter“-Monomere 2-Hydr und GAMA zeigte eine geringfügig größere Reaktivität beim 2-Hydr-Monomer.

Tabelle 5.5: Zusammensetzung der Polymerisationslösungen und der Copolymere

Monomer 1 [m1]	Monomer 2 [m2]	Monomer 3 [m3]	Lösung [wt m1/wt m2/wt m3]	Polymer [wt m1/wt m2/ wt m3]
Acrylsäure	Acrylamid		50/50	50/50
2-Hydr	Bis		50/50	95/5
2-Hydr	β -Cyc		50/50	89/11
2-Hydr	NTA		75/25	87/13
Acrylsäure	Bis		50/50	80/20
β -Cyc	Bis		50/50	78/22
GAMA	Bis		50/50	87/13
2-Hydr	Dode		50/50	50/50
2-Hydr	Bis	β -Cyc	20/60/20	86/4/10
2-Hydr	Bis	β -Cyc	60/30/10	91,5/2,5/6
GAMA	Bis	β -Cyc	20/60/20	89/4/7
GAMA	Bis	β -Cyc	60/30/10	88,5/3,5/8
2-Hydr	Bis	NTA	20/60/20	83/6/11
2-Hydr	Bis	NTA	60/30/10	82/6/12
GAMA	Bis	NTA	20/60/20	88/3/9
GAMA	Bis	NTA	60/30/10	89/3/8
2-Hydr	Bis	Dode	50/25/25	47,5/5/47,5

Zur weiteren Analyse der Copolymere sind die Reaktionsverhältnisse r_1 und r_2 , der binären Mischungen, mit Hilfe der Mayo-Lewis Gleichung bestimmt worden.^[136] Dabei war $r_1=k_{11}/k_{12}$ und $r_2=k_{22}/k_{21}$, k sind hierbei die Reaktionskonstanten der entsprechenden Monomere. Mit diesen Parametern konnte dann die Taktizität der Copolymere abgeschätzt werden. Die Reaktionsverhältnisse r_1 und r_2 sind aus den Einzelmessungen graphisch bestimmt worden.

Bei der Mischung von Acrylsäure, Acrylamid sind die r_1 Werte allerdings der Literatur^[137] entnommen und die r_2 Werte mit Hilfe der umgestellten Mayo-Lewis Gleichung berechnet worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.6 aufgetragen.

Aus den Ergebnissen ergibt sich dann für die Mischung von Acrylsäure und Acrylamid eine statistische Polymerisation. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, eine Acrylsäure direkt neben einem Acrylamid zu finden, etwas größer als die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Acrylsäuren bzw. zwei Acrylamide direkt nebeneinander liegen. Für die Mischungen Acrylsäure/Bis, 2-Hydr/Bis, 2-Hydr/ β -Cyc und 2-Hydr/Dode ergeben sich alternierende Copolymere. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um eine klare ABAB Anordnung, sondern um eine $[A]_n[B]_n$ Anordnung (die Menge n ergibt sich aus den Polymer-Zusammensetzungen aus Tabelle 5.5). Für die Mischung aus 2-Hydr/Bis ergibt sich eine Anordnung von $[2\text{-Hydr}]_{19}[\text{Bis}]_1$ und für die Mischung aus 2-Hydr/ β -Cyc von $[2\text{-Hydr}]_8[\beta\text{-Cyc}]_1$. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Bis bzw. zwei β -Cyc Monomere miteinander reagieren, ist äußerst gering. Für die Monomerkombination aus Bis und β -Cyc ergibt sich ein Blockcopolymer. Die r -Werte der anderen Mischungen (2-Hydr/NTA, GAMA/Bis) ergeben statistische Copolymere. Wobei auch bei diesen Mischungen aufgrund der geringen Menge an Bis bzw. NTA im Polymer die Wahrscheinlichkeit, zwei dieser Monomereinheiten nebeneinander zu finden, gering ist.

Für die ternären Mischungen konnten mit der Mayo-Lewis Gleichung keine Reaktionsverhältnisse bestimmt werden. Allerdings konnten die Taktizitäten dieser Copolymere aus den Daten für die binären Copolymer abgeschätzt werden.

Für die Mischungen aus 2-Hydr/Bis/ β -Cyc, GAMA/Bis/ β -Cyc, 2-Hydr/Bis/NTA und GAMA/Bis/NTA konnten dabei alternierende Strukturen angenommen werden. Die Taktizität für diese Mischungen ist eine $[A]_n[B]_m[A]_n[C]_o$ Anordnung. Konkret heißt das, dass für die Mischung aus 2-Hydr/Bis/NTA eine Anordnung aus $[2\text{-Hydr}]_{14}[\text{Bis}]_1[\text{NTA}]_2$ erhalten wird. Für die Mischung 2-Hydr/Bis/Dode ist ein statistisches Copolymer ohne spezifische Taktizität am wahrscheinlichsten. Es konnte dabei aber davon ausgegangen werden, dass keine Bis Monomere miteinander reagiert haben.

Tabelle 5.6: Reaktionsverhältnisse für binäre Copolymere

Monomer 1 [m1]	Monomer 2 [m2]	r1	r2
Acrylsäure	Acrylamid	0,60	0,59
2-Hydr	Bis	0,31	0,13
2-Hydr	β -Cyc	0,11	0,01
2-Hydr	NTA	0,89	0,78
Acrylsäure	Bis	0,21	0,04
β -Cyc	Bis	3,59	12,88
GAMA	Bis	0,89	0,78
2-Hydr	Dode	0,60	0,36

5.3.5 Vergleich „Typ I“ Photoinitiator mit „Synergist Immobilisierung“

Um das neue „Typ I“ Photoinitiator System mit einem etablierten zu vergleichen sind Pfropf-Polymerisationen mit den drei Protokollen des „Typ I“ Photoinitiator Systems, nach dem Protokoll der „Synergist Immobilisierung“ und mit Kontrollproben ohne Photoinitiator durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5.7 aufgetragen.

Tabelle 5.7 Vergleich der Verschiedenen Pfropf-Methoden. Die Ergebnisse für „syn. Immo.Lit. Daten“ sind aus Literatur^[49]. n.d. ... nicht bestimmt

Membran	Methode	PI auf der Oberfläche [pmol / cm ²]	PI in Lösung [mol / l]	Menge an PI total [mol]	DG [µg / cm ²]
PET	syn. immo. Lit. Daten		1,2	$1.2 \cdot 10^{-3}$	2.3 ± 0.4
PET	syn. immo.		1,2	$1.2 \cdot 10^{-3}$	2.2 ± 0.3
PET	Methode 1	n.d.		n.d.	1.6 ± 0.5
PET	Kontrolle	0			0.0 ± 0.0
Cellulose	syn. immo.		1,2	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$6.0 \pm 3,0$
Cellulose	Methode 2	n.d.		n.d.	1.4 ± 0.3
Cellulose	Methode 3	57		$1.7 \cdot 10^{-7}$	1.6 ± 0.4
Cellulose	Kontrolle	0			0.0 ± 0.0

Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Kontrollmessungen ohne Photoinitiator keine Pfropfung beobachtet werden konnte. Weiterhin ist für die Cellulose-Membranen mit der „Synergist Immobilisierung“ keine kontrollierte Reaktion beobachtet worden. Bei dieser Methode sind hohe, aber schlecht reproduzierbare DG-Werte erhalten worden. Für die anderen Membranen sind einheitliche DG-Werte erreicht worden. Dabei ist der DG-Wert für alle drei „Typ I“ Photoinitiator Protokolle etwas geringer als der DG-Wert, der mit dem Protokoll der „Synergist Immobilisierung“ erreicht worden ist. Allerdings sind die Pfropf-Polymerisationen, nach dem „Typ I“ Photoinitiator Protokoll, auf den Cellulose-Membranen deutlich kontrollierter und zeigen eine geringere Abweichung zwischen den einzelnen Messungen. Beim Vergleich der DG-Werte muss aber auch noch die Menge an Photoinitiator beachtet werden. Diese ist bei den „Typ I“ Photoinitiator Protokollen mit $\sim 2 \cdot 10^{-7}$ mol deutlich geringer als für die „Synergist Immobilisierung“. Bei der „Synergist Immobilisierung“ ist mit einer Photoinitiatormenge von $\sim 1 \cdot 10^{-3}$ mol gearbeitet worden. Diese Differenz zeigt dazu noch einen starken Einfluss auf die Nebenreaktionen. Die Abbildung 5.35 zeigt die unterschiedlichen Molmassen der Nebenprodukte. Diese Nebenprodukte sind parallel zur Pfropf-Reaktion gebildet worden. Die Menge an Nebenprodukt ist dabei über die Fläche der GPC-Peaks berechnet worden. Für die „Synergist Immobilisierung“ ergibt sich aus der Berechnung eine recht große Menge an Nebenprodukt. Diese Menge beläuft sich

auf 15% des eingesetzten Monomers und hat ein hohes Molekulargewicht von ungefähr 750 kg/mol. In Gegensatz dazu ist nach den Pfropf-Polymerisationen mit dem „Typ I“ Photoinitiator nur 1% Nebenprodukt gefunden worden. Das Nebenprodukt ist dabei in zwei verschieden große Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion zeigt ein Molekulargewicht von 1 kg/mol und die zweite zeigt ein etwas größeres Molekulargewicht von 6 kg/mol.

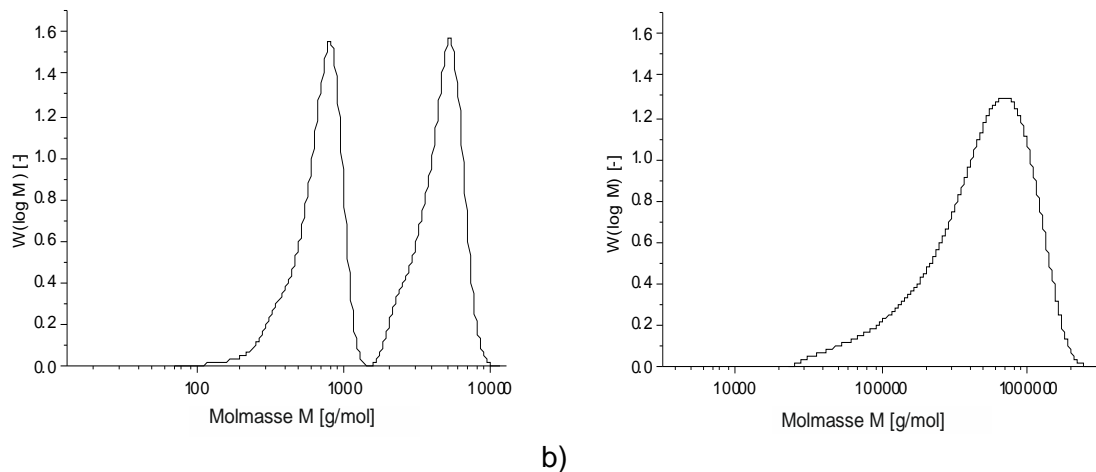


Abbildung 5.35 Direkter Vergleich eines „Typ I“ Photoinitiator Systems (a) und der „Synergist Immobilisierung“ (b) Pfropf-Polymerisationen von 2-Hydr mit gleicher UV Zeit und gleichem DG-Wert führen zu unterschiedlichen Mengen an Nebenprodukten ca. 1% für „Typ I“ Photoinitiator Systems und 15% für die „Synergist Immobilisierung“.

5.4 Proteinbindungskapazitäten

Die Proteinbindungskapazitäten sind wie in Abschnitt 4.7.1 beschrieben bestimmt worden. Die Messungen sind für die PET-Membranen und die Cellulose-Membranen nach demselben Verfahren erfolgt. Die eingesetzte Proteinmenge ist dabei speziell auf die Membranen abgestimmt worden. Jeweils die 1,5 fache Proteinmenge als für die Adsorption einer Monoschicht benötigt wird, wird eingesetzt. Die für eine Monoschicht theoretisch benötigte Proteinmenge ist berechnet worden. Zur Berechnung der Monoschicht werden der hydrodynamische Radius des Proteins (hier IgG), die Molmasse des Proteins und die komplette Oberfläche einer Membran verwendet. Für die PET-Membranen ergibt sich so eine Monoschichtkapazität von 2,8 mg/ml Membran oder 0,11 mg/Membranprobe. Die Monoschichtkapazität der Cellulose-Membranen ist auf Grund der größeren spezifischen Oberfläche deutlich größer und hat einen Wert von 8 mg/ml Membran bzw. 1,16 mg/Membranprobe. Die Einheit mg/ml Membran ist dabei eine Normierung, um die PET-Membranen und die Cellulose-Membranen vergleichen zu können. Dabei bestand ein ml Membran aus 25,06 PET-Membranproben oder aus 6,9 Cellulose-Membranproben. Die

spezifische Oberfläche einer Membranprobe ist bei den PET-Membranen 479 cm^2 und bei den Cellulose-Membranen 2993 cm^2 .

5.4.1 Statische Adsorption auf PET-Membranen

Die statischen Adsorptionen auf den PET-Membranen sind als Referenzversuche durchgeführt worden. Diese Versuche sollten zeigen, welche Copolymere für den Einsatz als Adsorbermaterial geeignet sind. Zusätzlich sollte damit ermittelt werden, wie sich das Adsorptionsverhalten verändert, wenn die Menge an Aminosäurespezifischen Monomeren durch ein „Abstandhalter“-Monomer verringert worden ist. Die Adsorptionen sind also mit Membranen durchgeführt worden, die ohne „Abstandhalter“-Monomer, (Abb. 5.36) und mit Membranen, die mit „Abstandhalter“-Monomer modifiziert worden sind (Abb. 5.37). Für die Ergebnisse ist wieder der Durchschnittswert aus den Werten von mindestens drei Membranen mit gleicher Modifizierung ermittelt worden. Die Ergebnisse der Adsorption zeigen dabei an, wie viel Protein nach dem Adsorptionsschritt auf der Membran vorliegt. Die Ergebnisse der Desorption sind die Proteinmengen, die nicht durch den Waschvorgang von der Membran entfernt worden sind. Die Durchführung der Messungen ist in Abschnitt 4.7.1 beschrieben.

Die Ergebnisse zeigen generell keine großen Abweichungen zwischen den Membranen, die mit „Abstandhalter“-Monomer und die ohne modifiziert worden sind. Beide Modifizierungsarten zeigen hohe Adsorptionswerte für die Basismembran und die Mischungen mit den funktionalen Monomeren Bis, Bis/ β -Cyc, Bis/Dode, Bis/C-Hex, β -Cyc/C-Hex und C-Hex. Die Werte für diese Membranen liegen zwischen $1,75 \text{ mg/ml}$ Membran und 3 mg/ml Membran. Zusätzlich zeigen noch die Modifizierungen aus β -Cyc, β -Cyc/Dode, β -Cyc/Ammo und C-Hex/Ammo Adsorptionswerte von etwa $1,5 \text{ mg/ml}$ Membran. Diese Werte werden aber nur erreicht, wenn die Membranen ohne „Abstandhalter“-Monomer modifiziert worden sind. Alle anderen Modifizierungen zeigen nur geringe Adsorptionswerte von ca. $0,5 \text{ mg/ml}$ Membran.

Nach dem Waschvorgang und der Desorption zeigen sich aber keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Modifizierungsarten. Nach der Desorption konnte nur noch für die Modifizierung aus Bis/ β -Cyc ein hoher Wert von 2 mg/ml Membran gefunden werden. Die Modifizierungen mit den nächst höheren Werten sind Bis/Dode, Bis/C-Hex, β -Cyc/C-Hex und C-Hex. Diese Modifizierungen zeigen Desorptionswerte zwischen $0,7 \text{ mg/ml}$ Membran und 1 mg/ml Membran. Die Ergebnisse sind dabei wie schon erwähnt unabhängig davon, ob die Membranen mit oder ohne „Abstandhalter“-Monomer modifiziert worden ist. Die restlichen Modifizierungen zeigen noch geringere Desorptionswerte von weniger als $0,7 \text{ mg/ml}$ Membran. Dabei ist häufig sogar ein Wert von unter $0,5 \text{ mg/ml}$ Membran gefunden worden.

Die Standardabweichungen der Messungen liegen für die Adsorption bei ca. 15%, mit Ausnahme der Modifizierung 2-Hydr/Ammo. Bei dieser Mischung ist der Fehler mit fast

400% deutlich größer. Bei den Desorptionswerten ist keine so deutliche Abweichung zu erkennen. Die Abweichung liegt hier für alle Modifizierungen zwischen 10% und 13%.

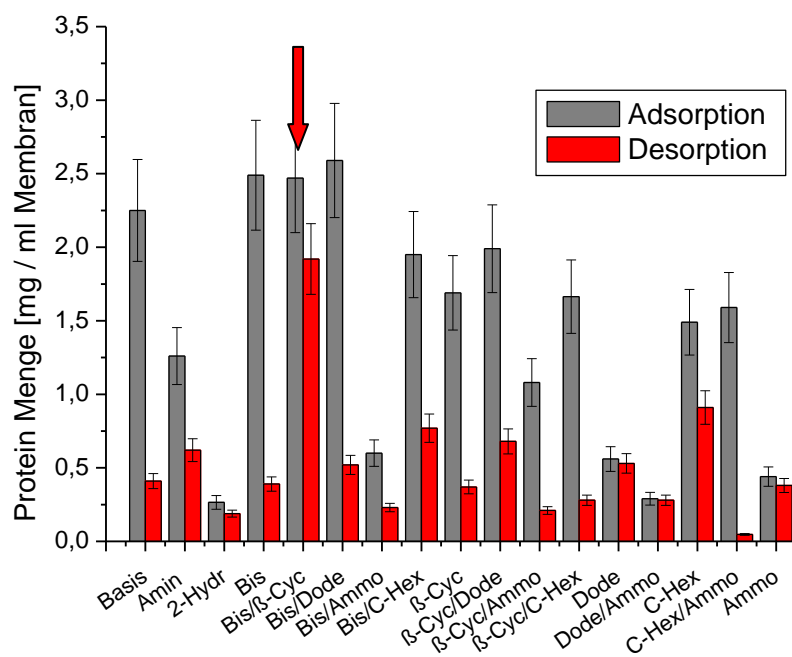


Abbildung 5.36 Ergebnisse der statischen Adsorption von IgG auf den modifizierten PET-Membranen. Modifizierungen ohne „Abstandhalter“-Monomer

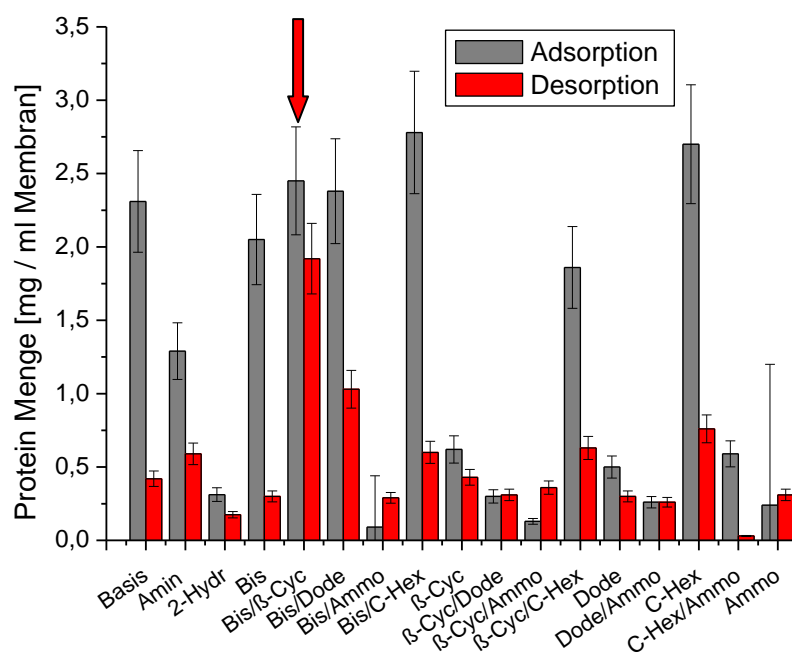


Abbildung 5.37 Ergebnisse der statischen Adsorption von IgG auf den modifizierten PET-Membranen. Modifizierungen mit 2-Hydr als Abstandhalter Monomer.

5.4.2 Statische Adsorption auf Cellulose-Membranen

Im Gegensatz zu den PET-Membranen, die nur als Referenzmaterial dienen, sollten die Cellulose-Membranen als Adsorbermaterial verwendet werden. Dazu ist die statische Adsorption dieser Membranen mit und ohne Beschichtung ermittelt worden. Die Modifizierungen sind dabei die gleichen wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben. Zusätzlich zu den Modifizierungen in Abbildung 5.37 sind noch weitere Modifizierungen untersucht worden. Diese Beschichtungen bestehen dabei aus funktionalen Monomeren und dem „Abstandhalter“-Monomer 2-Hydr. Die Ergebnisse sind auch hierbei wieder aus den Werten für mindestens drei gleiche Membranen berechnet worden und die Abweichung der Werte sind bestimmt worden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 5.38 aufgetragen.

Auch bei den Cellulose-Membranen haben mehrere Membranen mit unterschiedlicher Modifizierung eine gute Adsorptionsfähigkeit gezeigt. Die besten Ergebnisse zeigen dabei die Membranen mit NTA als Funktionalmonomer. Diese Membranen zeigen Adsorption von 4,5 mg/ml Membran. Die nächsthöhere Adsorptionsfähigkeit von 1,5 - 2 mg/ml Membran ist von recht vielen Membranen erreicht worden. Die Membranen haben in ihren Beschichtungen die Funktionalmonomere Bis, Bis/ β -Cyc, Bis/Dode, Bis/Ammo, Bis/C-Hex, β -Cyc, β -Cyc/Dode, β -Cyc/Ammo, β -Cyc/C-Hex, C-Hex, C-Hex/Ammo und Ammo. Die anderen Modifizierungen zeigen dagegen keine hohe Adsorptionsfähigkeit. Die Adsorption der Basismembranen ist mit ca. 1 mg/ml Membran hierbei noch die höchste. Der Rest der Membranen zeigt Adsorptionskapazitäten von < 0,5 mg/ml Membran.

Bei der Desorption nach dem Waschvorgang zeigen sich einige Unterschiede im Vergleich zu den PET-Membranen. Während bei den PET-Membranen nur die Beschichtung aus Bis/Cyc eine hohe Desorption zeigt, wird bei den Cellulose-Membranen auch noch die Beschichtung aus Bis, Bis/Dode, Bis/C-Hex und NTA (bei PET nicht untersucht) eine hohe Desorption erhalten. Die Desorptionenwerte für diese Membranen liegen für NTA bei 3,5 mg/ml Membran und bei den anderen Modifizierungen bei 1,5-2 mg/ml Membran. Die Beschichtung mit Bis zeigt dabei eine Desorption von über 100%. Diese zu hohe Desorption ist auf das verwendete BCA-Kit zurückzuführen. Dieses führt zu einem Fehler von durchschnittlich 25% für die Adsorptionsergebnisse und 22,5% für die Desorptionsergebnisse. Der Fehler ist somit etwas größer als bei den PET-Membranen. Dieser höhere Fehler ist wahrscheinlich auf die inhomogenere Struktur der Cellulose-Membranen zurückzuführen. Dadurch variiert die spezifische Oberfläche stärker als bei den PET-Membranen. Allerdings sind die Kapazitäten mit der durchschnittlichen Oberfläche berechnet worden. Daraus resultiert eine Erhöhung des Messfehlers bei den Cellulose-Membranen.

Für die meisten anderen Membranen sind Werte für die Desorption erhalten worden, die im Bereich von 60% - 20% der adsorbierten Proteinmenge liegen. Einzige Ausnahme bildet

hierbei die Beschichtung aus Dode/Ammo. Diese Beschichtung zeigt nur eine sehr geringe Desorption. Die gefundene Proteinmenge entspricht dabei nur 2% des adsorbierten Proteins. Von den Modifizierungen, die nur auf Cellulose getestet wurden, zeigt nur das NTA eine hohe Adsorptionsfähigkeit. Gleichzeitig hat dieses Polymer auch noch die höchste IgG-Kapazität. Alle anderen Modifizierungen mit Bzamidin oder B(OH)₂ haben eine geringere Adsorptionsfähigkeit als die Basismembranen.

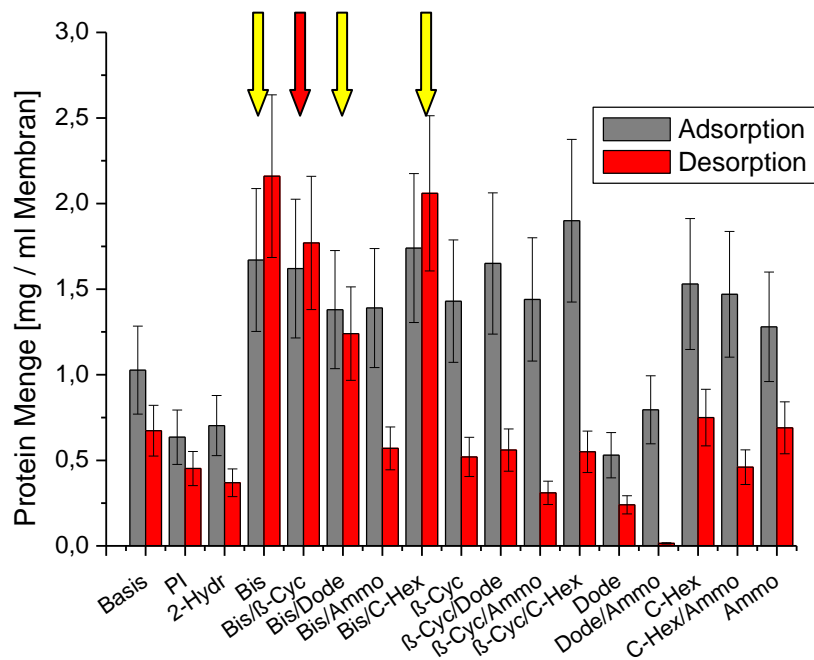


Abbildung 5.38 Ergebnisse der statischen Adsorption von IgG auf den modifizierten Cellulose-Membranen. Modifizierungen mit 2-Hydr als Abstandhalter Monomer. Die DG-Werte der Membranen sind in Abbildung 5.26 aufgetragen

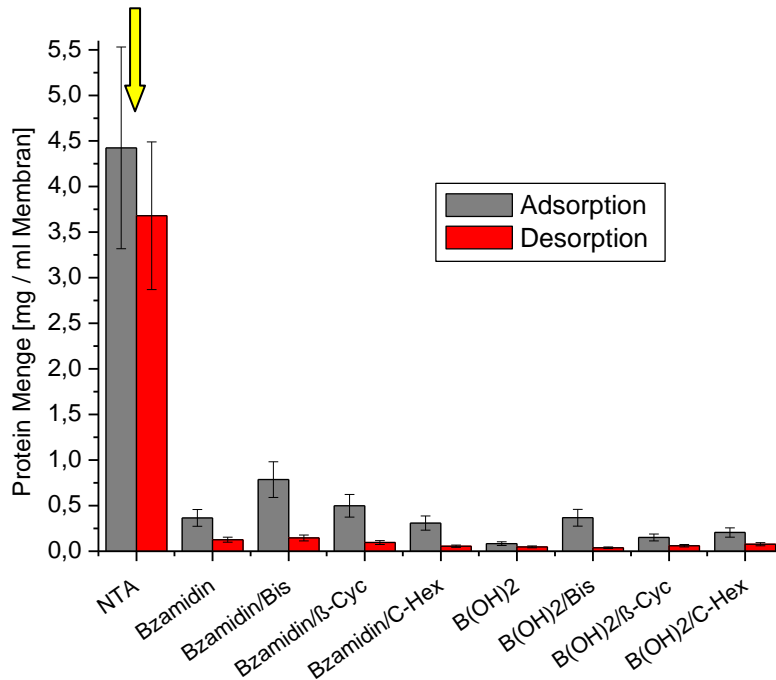


Abbildung 5.39 Ergebnisse der statischen Adsorption von IgG auf den modifizierten Cellulose-Membranen (Erweiterte Monomerauswahl). Modifizierungen mit 2-Hydr als Abstandhalter Monomer. Die DG-Werte der Membranen sind in Abbildung 5.26 aufgetragen.

Zum Vergleich mit den Funktionalmonomeren sind noch Cellulose-Membranen mit den konventionellen Ionenaustauschern 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (AMPS), Vinylsulfonsäure (VS), Vinylphosphonsäure (VP) modifiziert worden. Mit diesen Membranen sind dann auch statische Adsorptionsexperimente durchgeführt worden. Die Ergebnisse und die Standardabweichung dieser Membranen sind wieder berechnet worden.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Abbildung 5.40. Diese zeigen durchweg recht hohe Adsorptionskapazitäten von 5,5 mg/ml Membran für das AMPS und 3 - 3,5 mg/ml Membran für VS und VP. Auch die Ergebnisse der Desorptionen zeigen hohe Werte. Dabei sind durchschnittlich 88% des adsorbieren Proteins wieder desorbiert worden. Die Standardabweichung der Messungen beträgt 10% bei den Adsorptionsmessungen und 12% bei den Desorptionsmessungen.

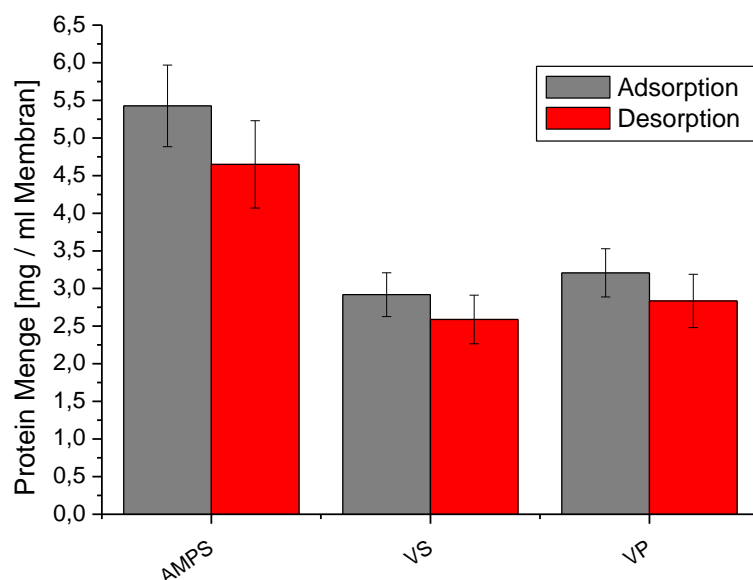


Abbildung 5.40 Ergebnisse der statischen Adsorption von IgG auf Cellulose-Membranen modifiziert mit konventionellen Ionenaustauschern. Die DG-Werte sind in Abschnitt 5.3.1 beschrieben. Modifizierungen mit 2-Hydr als Abstandhalter Monomer im Verhältnis 3/1.

Auch mit den „besten Adsorbieren“ sind statische Adsorptionstests durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 5.41 aufgetragen. Bei diesen Tests konnte deutlich erkannt werden, ob β -Cyc oder NTA als zweites Monomer eingesetzt worden ist. Die Werte für die Membranen bei denen β -Cyc als zweites Monomer eingesetzt worden ist, zeigen Adsorptionskapazitäten von 2,5 - 3 mg/ml Membran. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Beschichtungen liegen dabei im Bereich der Standardabweichung, also unter 15%. Es zeigen sich auch keine Unterschiede, ob 2-Hydr oder GAMA als Abstandhalter eingesetzt worden ist. Die Menge an Abstandhalter in der Polymerisationslösung zeigt auch keinen Einfluss auf die Adsorption. Nach der Desorption des Proteins sind bei diesen Membranen 88% - 107% des adsorbierten Proteins wiedergefunden worden. Die 107% sind auch wieder auf eine generelle Abweichung von 15% innerhalb der Messung zurückzuführen.

Wie schon gesagt, zeigt der Wechsel von β -Cyc zum NTA einen deutlicheren Einfluss auf die Adsorption. Die Adsorptionskapazität dieser Co-Polymere beträgt 5 – 5,5 mg/ml Membran und ist damit größer als die der Polymere mit β -Cyc. Auch bei diesen Polymeren zeigt sich kein Einfluss des Abstandhalters auf die Adsorption, und der Unterschied der einzelnen IgG Kapazitäten ist kleiner als die Standardabweichung mit 15%. Dieselbe Tendenz zeigt sich auch bei den Desorptionsmessungen. Bei diesen Membranen sind allerdings nur 68% - 85% des adsorbierten Proteins zurückerhalten worden. Der Verlust an

Protein ist daher bei diesen Membranen größer als bei den Membranen mit β -Cyc. Die Standardabweichung der einzelnen Messungen ist aber bei allen Co-Polymeren mit ungefähr 15% gleich groß.

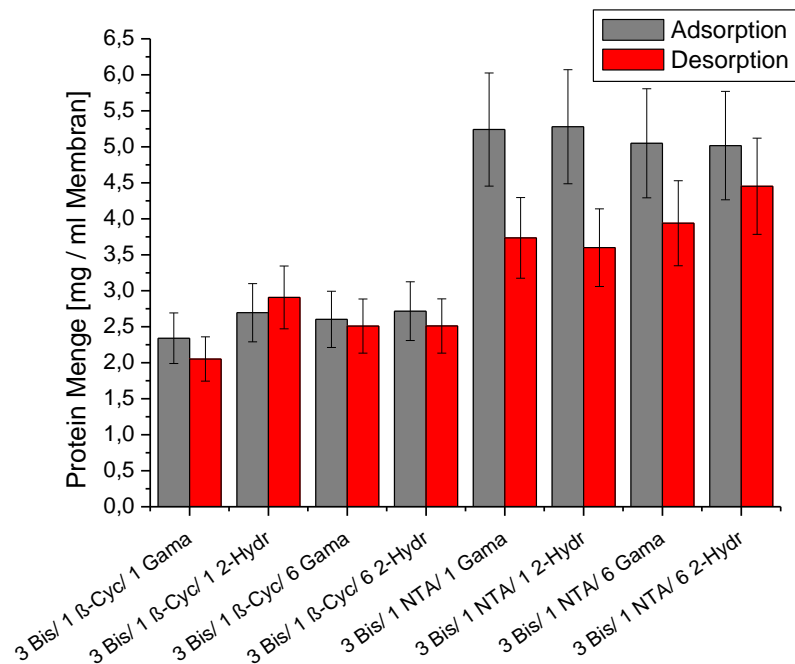


Abbildung 5.41 Adsorption und Desorption der „besten Adsorber“.

5.4.3 Adsorptionsisothermen

Von einigen ausgewählten Membranen sind Isothermen aufgenommen worden (Abschnitt 4.7.1.1). Die Membrane sind dafür entweder mit konventionellen Ionenaustauschern oder mit gut bindenden Monomermischungen beschichtet worden. Die Isothermen sind mittels statischer Adsorption ermittelt worden. Dazu ist jeweils die adsorbierte- und die desorbierte IgG Menge bei verschiedenen Konzentrationen ermittelt worden. Die erhaltenen Konzentrationen sind dann graphisch aufgetragen worden. Diese Auftragungen zeigen alle einen Langmuirverlauf (Abb. 5.42) Daher wurden die Sorptionskoeffizienten (K_{Ad} , K_{De}) mit Hilfe des Langmuir-Modells berechnet (Formel 10).

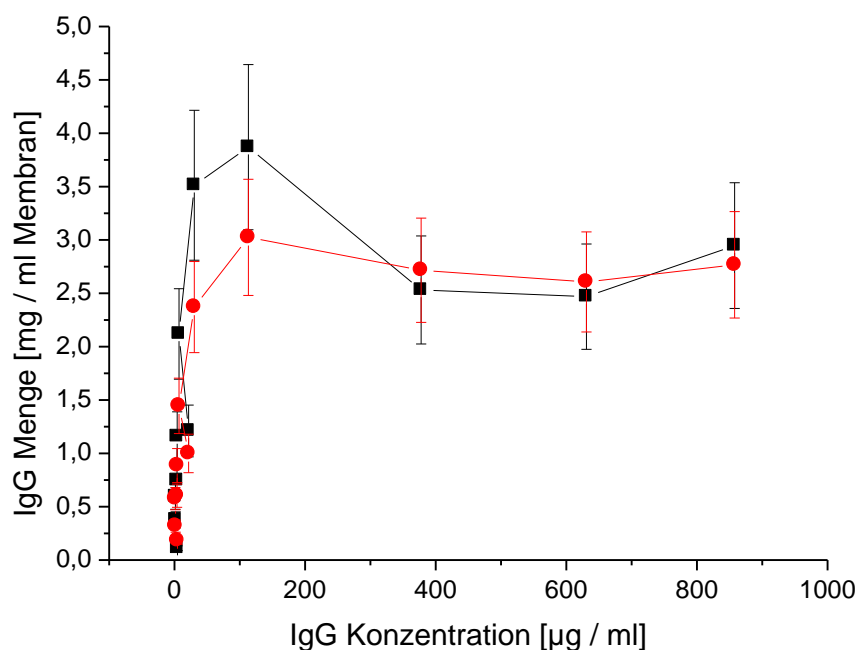


Abbildung 5.42 Beispiel des Verlaufs von Adsorptionsisothermen. (Beschichtung mit 3 Bis / 1 β -Cyc/ 1 GAMA)

Neben den Sorptionskoeffizienten konnte so auch noch die maximale Kapazität (q_{\max}) des Sorbents bestimmt werden (Formel 11.3). Diese ist ein Anhaltspunkt für die Qualität der Messung. Die so erhaltenen Daten sind in Tabelle 5.8 aufgetragen. Die Membranen mit der Ionenaustauscherbeschichtung sollen bei den Messungen als Referenz dienen. Die Bindungskonstanten nach der Adsorption (K_{Ad}) liegen für diese Membranen im Bereich von 40-100 ml/mg und decken sich damit ganz gut mit den in der Literatur^[138] gefundenen Werten für geladene Polymere. Die Literaturwerte für diese Polymere liegen im Bereich von 17-100 ml/mg. Allerdings zeigt sich auch, dass die ermittelten Bindungskonstanten nach dem Waschvorgang und der Desorption (K_{De}) zum Teil größer sind als die Literaturwerte. Dabei sinkt beim AMPS der K_{De} im Vergleich zu K_{Ad} trotz identischer q_{\max} Werte. Das genau umgekehrte Phänomen tritt bei den anderen beiden Ionenaustauscherbeschichtungen auf. Hierbei sinkt der q_{\max} Wert für die Desorption, und der Bindungskonstanten steigen an. Beim Vergleich der q_{\max} Werte mit den experimentell bestimmten Werten fällt auf, dass sie im gleichen Bereich liegen. Auch die Anpassung der ermittelten Regressionsgraden ist mit 97%-99% gut.

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Bindungskonstanten für die Monomermischungen mit 1 Bis/3 2-Hydr, 1 Bis/1 β -Cyc/3 2-Hydr, 3 Bis/1 NTA/1 2-Hydr und 1 Bis/1 Dode/3 2-Hydr im gleichen Bereich wie die Ergebnisse der Ionenaustauschermonomere liegen. Diese Mischungen zeigen auch dieselben Zusammenhänge zwischen den

Bindungskonstanten und q_{\max} . Das heißt, wenn K_{De} größer ist als K_{Ad} , sind die q_{\max} Werte kleiner. Bei der Betrachtung der Monomermischungen 1 Bis/1 β -Cyc/3 2-Hydr, 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr, 3 Bis/1 β -Cyc/1 GAMA, 3 Bis/1 β -Cyc/6 GAMA und 1 β -Cyc/3 2-Hydr zeigen sich deutlich größere Bindungskonstanten als bei den Ionenaustauschermembranen. Zusätzlich zeigen diese Membranen auch hohe q_{\max} Werte, welche mit den hohen Werten der AMPS Membranen vergleichbar sind. Beim Vergleich der K_{Ad} Werte dieser Membranen mit K_{De} Werten fällt auf, dass die K_{De} Werte kleiner sind als die K_{Ad} Werte. Bei den q_{\max} Werten sind hingegen keine großen Änderungen festzustellen.

Für die Monomermischungen 3 Bis/1 NTA/6 2-Hydr, 3 Bis/1 NTA/1 GAMA und 3 Bis/1 NTA/6 GAMA können die gleichen Tendenzen festgestellt werden, wie für die Mischungen mit β -Cyc als zweites Monomer. Auch hier fällt beim Vergleich der K Werte auf, dass die K_{De} Werte kleiner sind als die K_{Ad} Werte. Bei den q_{\max} Werten hingegen ist festzustellen, dass die q_{\max} Werte größer sind als die q_{\max} Ad Werte.

Die Mischungen aus 1 NTA/3 2-Hydr, 1 Dode/3 2-Hydr und 1 Bis/1 Dode/3 2-Hydr zeigen hingegen recht geringe K_{Ad} aber sehr große K_{De} Werte. Auch die q_{\max} Werte sind hierbei nach dem Waschvorgang deutlich kleiner.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der Bindungskonstanten nach der Adsorption und der Desorption.

	K_{Ad} [ml/mg]	K_{De} [ml/mg]	q_{\max} Ad [mg/ml]	q_{\max} De [mg/ml]	r^2 Ad	r^2 De
AMPS	100	47	5,0	5,0	0,97	0,99
VP	85	267	3,3	2,5	0,99	0,98
VS	38	235	3,3	2,5	0,97	0,97
1 Bis/3 2-Hydr	34	100	2,5	2,0	0,99	0,99
1 Bis/ 1 β-Cyc/3 2-Hydr	31	161	2,5	2,0	0,93	0,99
3 Bis / 1 β-Cyc/ 1 2-Hydr	455	260	4,0	4,9	0,97	0,97
3 Bis / 1 β-Cyc/ 1 GAMA	328	124	3,9	3,8	0,99	0,99
3 Bis / 1 β-Cyc/ 6 2-Hydr	975	503	4,6	4,6	0,99	0,99
3 Bis / 1 β-Cyc/ 6 GAMA	1184	587	4,7	4,7	0,99	0,98
3 Bis / 1 NTA/ 1 2-Hydr	80	70	2,5	2,5	0,97	0,99
3 Bis / 1 NTA/ 1 GAMA	211	176	2,5	3,3	0,99	1,00
3 Bis / 1 NTA/ 6 2-Hydr	182	81	2,5	3,3	0,99	0,99
3 Bis / 1 NTA/ 6 GAMA	182	77	2,5	3,3	0,99	1,00
1β-Cyc/3 2-Hydr	343	292	0,8	0,7	0,95	0,97
1NTA/3 2-Hydr	74	471	1,3	1,0	0,97	0,99
1Dode/3 2-Hydr	32	462	2,0	1,7	0,94	0,99
1 Bis/ 1 Dode/3 2-Hydr	24	211	2,0	1,3	0,97	0,99

5.4.4 Dynamische Adsorption

Die dynamischen Adsorptionen sind wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben durchgeführt worden. Allerdings werden bei diesen Adsorptionen nur ausgewählte Cellulose-Membranen verwendet. Aufgrund der geringen Kapazität der einzelnen PET-Membranen ist auf Tests mit diesen Membranen verzichtet worden. Bei den Tests werden die Basismembranen, die Membranen mit den konventionellen Ionenaustauscher AMPS, VS und drei der „besten Adsorber“ verwendet. Die „besten Adsorber“ sind die, welche in Tabelle 5.8 die höchsten K-Werte zeigen, also 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr, 3 Bis/1 β -Cyc/6 GAMA und zusätzlich die Beschichtung aus 3 Bis/1 NTA/6 GAMA. Die Ergebnisse in Abbildung 5.43 sind aus drei Messungen eines Membranstapels berechnet worden.

Bei diesen Messungen zeigen sich für die Basismembranen und die Membranen mit den Beschichtungen 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr, 3 Bis/1 β -Cyc/6 GAMA ähnliche Adsorptionskapazitäten wie bei den statischen Messungen. Dabei adsorbierten die Basismembranen ca. 1 mg/ml Membran und die Beschichtungen 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr und 3 Bis/1 β -Cyc/6 GAMA jeweils 2,5 mg/ml Membran. Auch für die Beschichtungen aus 3 Bis/1 NTA/6 GAMA und 2-Hydr/AMPS sind Werte von 2,5 mg/ml Membran gefunden worden. Diese sind damit etwa um den Faktor zwei kleiner als die Ergebnisse der statischen Adsorptionsmessungen. Auch die Beschichtung mit 2-Hydr/VS zeigt mit 1,5 mg/ml Membran eine um 40% geringere Adsorptionsfähigkeit als bei den statischen Messungen. Bei der Desorption des Proteins nach dem Waschen zeigt die Beschichtung mit 2-Hydr/VS die besten Ergebnisse mit 88% des adsorbierten Proteins. Die „besten Adsorber“ und die Basismembran zeigen alle Werte um 80% zurückgewonnenes Protein, und die Beschichtung mit 2-Hydr/AMPS zeigt mit nur 57% des adsorbierten Proteins die geringsten Werte. Die Abweichung dieser Messungen liegt bei der Adsorption bei einem konstanten Wert von 18%. Für die Desorption war die Abweichung aber abhängig von der Beschichtung. Die geringste Abweichung zeigen mit 5% die Basismembranen und die Beschichtungen mit 3 Bis/1 β -Cyc/6 GAMA. Die Abweichung der anderen beiden „besten Adsorber“ liegen mit 25% schon deutlich höher, und die Ionenaustauscher zeigen mit knapp 40% die größte Abweichung zwischen den drei Messungen.

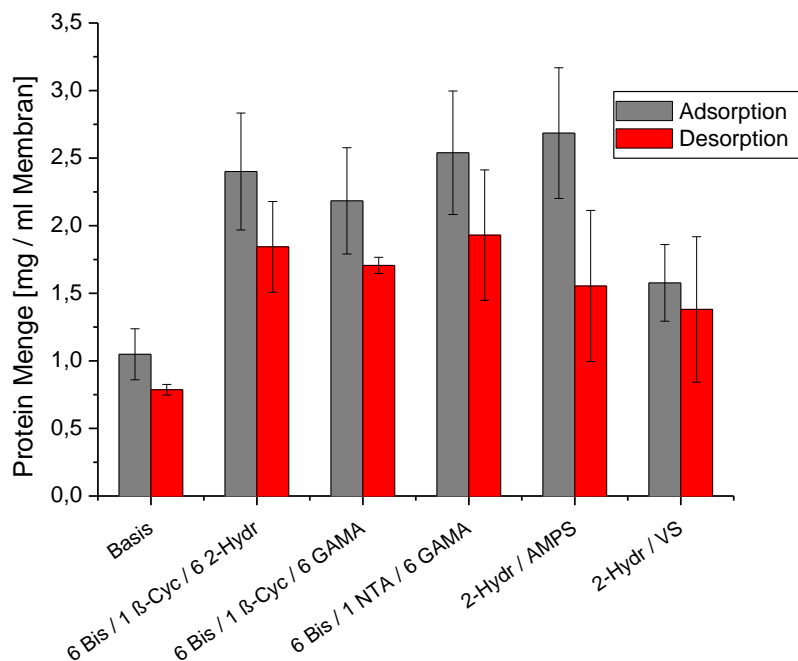


Abbildung 5.43 Ergebnisse der dynamischen Adsorptionsmessungen.

5.5 Protein Selektivitäten

Die Messung der Protein Selektivitäten ist eine entscheidende Bestimmung. Die Durchführung dieser Messungen ist in Abschnitt 4.8 beschrieben. Für die Messungen sind auch wieder nur die Cellulose-Membranen verwendet worden. Als qualitative Bestimmung sind alle Membranen mit der Mischungsmethode und Gel-Elektrophorese charakterisiert worden. Diese Charakterisierung dient als Screening und soll die IgG selektiven Beschichtungen filtern. Für die quantitativen Bestimmungen sind die Cellulose-Membranen als Basismembran und mit ausgewählten Beschichtungen eingesetzt worden. Als Beschichtungen sind die „besten Adsorber“, die konventionellen Ionenaustauscher und die Beschichtungen aus 2-Hydr/Bis, 2-Hydr/Bis/β-Cyc und 2-Hydr/β-Cyc zum Einsatz gekommen. Die quantitativen Messungen der Selektivitäten sind dabei entweder als Einzelmessung oder als Mischungsmessung durchgeführt worden. Die meisten Bestimmungen sind dabei mit HSA als Referenzprotein durchgeführt worden. Für das Lysozym sind die Selektivitäten nur über die Einzelmessmethode bestimmt worden, da bei den Mischungsmessungen keine IgG mehr in Anwesenheit des Lysozyms gefunden worden ist. Dieser Effekt ist dabei sowohl bei den Referenzlösungen als auch bei den Membranproben beobachtet worden.

5.5.1 Mischungsmethode durch Elektrophorese analysiert

Die Mischungsmethode, welche mittels Elektrophorese charakterisiert worden ist, dient zum Screening von allen Modifizierungen auf ihre IgG Selektivität. Dabei sind die Tests wie in Abschnitt 4.8.2 (Elektrophorese) beschrieben, durchgeführt worden. Pro Gel werden dabei acht Proben und eine Referenzlösung vermessen. Von allen bisher durchgeführten Modifizierungen sind jeweils zwei Membranen mit gleicher Beschichtung nach dieser Methode getestet worden. Ein Beispiel Gel ist in Abbildung 5.44 dargestellt. Die Abbildung zeigt bereits gefärbt und gewaschenes Gel. In allen getesteten Gelen ist die obere Bande dem IgG und die untere Bande dem HSA zu zuordnen. Mit dem Gel in Abbildung 5.44 sind verschiedene Proben gemessen worden. Diese Abbildung zeigt auch, dass die Charakterisierung der Selektivität nur qualitativ erfolgt. Die Detektionsgrenze liegt bei dieser Methode bei ca. 1 ng/mm² Gel.^[139]

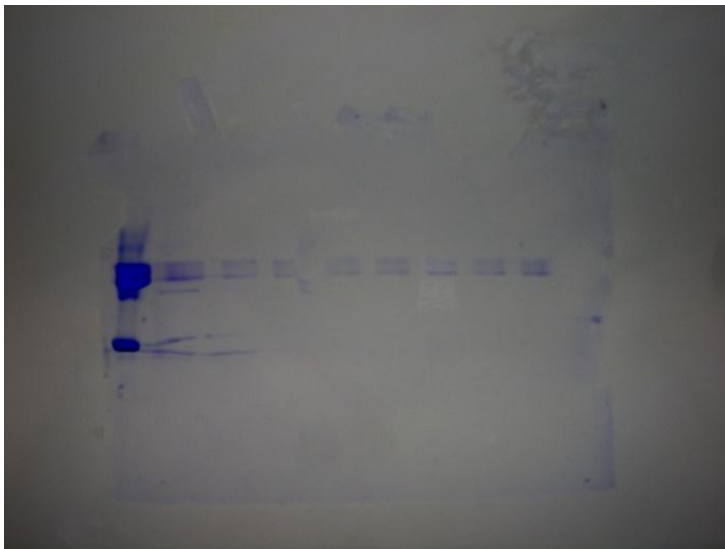


Abbildung 5.44 Elektrophorese Gele nach dem Färben und Waschen. Das Färben erfolgte mit Brillant Blau. Die obere Bande zeigte das IgG und die untere das HSA. Die Spuren von links nach rechts zeigen folgende Proben. 1.) Referenzlösung aus 0,5 mg/ml IgG und 0,5 mg/ml, 2.) De. Basismembran, 3.) De.2-Hydr Membran und 4.-9.) De.“beste Adsorber“. De. = Desorptionsergebnisse.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 5.9 aufgetragen. In dieser Tabelle sind alle Banden von der Adsorption und der Desorption aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass nach der Adsorption bei allen vermessenen Proben sowohl eine HSA Bande, als auch eine IgG Bande gefunden worden ist.

Die Messungen der Desorptionen sind auch wieder als Doppelbestimmungen durchgeführt worden. Es zeigt sich auch, dass für alle Beschichtungen die gleichen Banden bei den zwei Messungen gefunden worden sind.

Nach der Desorption zeigen sich dabei schon mehr Änderungen als nach den Adsorptionstests. Abhängig von der Modifizierung sind beide Banden, nur eine HSA, nur

eine IgG Bande oder gar keine Bande gefunden worden. Beide Banden bedeuten hierbei, dass keine Selektivität vorliegt, eine HSA Bande zeigt eine HSA Selektivität an und eine IgG Bande zeigt die gewünschte IgG Selektivität an und keine Bande deutete darauf hin, dass die desorbierte Menge an Protein zu gering für eine Detektion gewesen ist.

Von den gemessenen Proben zeigen nur die „besten Adsorber“, die Mischung 2-Hydr/Bis, 2-Hydr/Bis/ β -Cyc und die Modifizierungen mit den konventionellen Ionenaustauschern aus 2-Hydr/VS und 2-Hydr/VP eine IgG-Selektivität. Bei 10 Modifizierungen ist keine Selektivität gefunden worden. Darunter sind die Basismembranen und die Modifizierung mit 2-Hydr/AMPS, aber auch die mit 2-Hydr/NTA modifizierten Membranen. Auch zeigen die Mischungen 2-Hydr/ β -Cyc/Ammo, 2-Hydr/ β -Cyc/C-Hex, 2-Hydr/ β -Cyc/Bzamidin, 2-Hydr/Dode/Ammo, 2-Hydr/Dode/Bzamidin und 2-Hydr/Dode/B(OH)₂ keine Selektivität. Keine Bande ist für drei Modifizierungen gefunden worden. Bei diesen Modifizierungen handelt es sich um 2-Hydr/Bis/Dode, 2-Hydr/Bis/Ammo und 2-Hydr/Bis/C-Hex. Alle anderen vermessenen Modifizierungen zeigen eine HSA Selektivität.

Tabelle 5.9 Alle Ergebnisse der Elektrophorese Messungen. Alle Modifizierungen wurden mit 2-Hydr als „Abstandhalter“-Monomer durchgeführt.

Monomer- mischung	Adsorption		Desorption	
	IgG Bande	HSA Bande	IgG Bande	HSA Bande
Basis	ja	ja	ja	ja
2-Hydr	ja	ja	ja	ja
Bis	ja	ja	ja	nein
Bis / β-Cyc	ja	ja	ja	nein
Bis / Dode	ja	ja	nein	nein
Bis / Ammo	ja	ja	nein	nein
Bis / C-Hex	ja	ja	nein	nein
Bis / Bzamidin	ja	ja	nein	ja
Bis / B(OH)₂	ja	ja	nein	ja
β-Cyc	ja	ja	ja	ja
β-Cyc / Dode	ja	ja	nein	ja
β-Cyc / Ammo	ja	ja	ja	ja
β-Cyc / C-Hex	ja	ja	ja	ja
β-Cyc / Bzamidin	ja	ja	ja	ja
β-Cyc / B(OH)₂	ja	ja	nein	ja
Dode	ja	ja	nein	ja
Dode / Ammo	ja	ja	ja	ja
Dode / Bzamidin	ja	ja	ja	ja
Dode / B(OH)₂	ja	ja	ja	ja
Ammo	ja	ja	nein	ja

Ammo / C-Hex	ja	ja	nein	ja
Ammo / Bzamidin	ja	ja	nein	ja
Ammo / B(OH)2	ja	ja	nein	ja
Bzamidin	ja	ja	nein	ja
B(OH)2	ja	ja	nein	ja
Bzamidin / B(OH)2	ja	ja	nein	ja
NTA	ja	ja	ja	ja
Alle "besten Adsorber"	ja	ja	ja	nein
AMPS	ja	ja	ja	ja
VS	ja	ja	ja	nein
VP	ja	ja	ja	nein

5.5.2 Einzelmessungen

Bei der Einzelmessmethode ist die Selektivität über Messung der jeweiligen Proteinkapazität für die einzelnen Membranen getestet worden. Die Durchführung dieser Messungen ist in Abschnitt 4.8.1 beschrieben. Auch diese Messungen sind wieder als dreifache Bestimmung durchgeführt worden. Dabei ist immer im Wechsel die Kapazität von IgG und dann von HSA bzw. Lysozym getestet worden. Hierbei zeigt sich, dass sich die Adsorptionskapazität nach drei Adsorptions-, Desorptionszyklen nicht verändert (Abbildung 5.45). Aus den Ergebnissen für die einzelnen Messungen sind dann die Selektivitäten nach Formel (12) berechnet und die Standardabweichung ist mittels Fehlerfortpflanzung bestimmt worden.

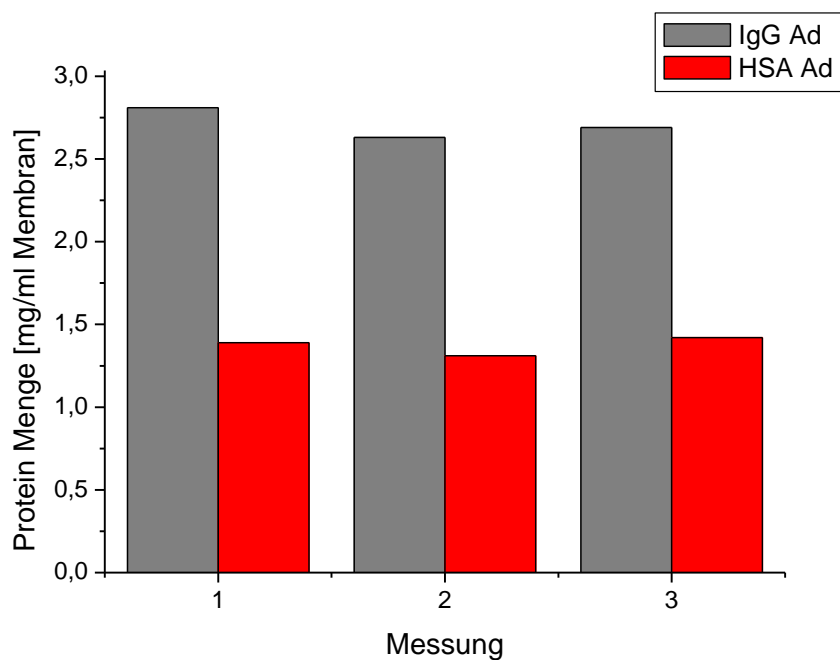


Abbildung 5.45 Exemplarisches Ergebnis der einzelnen Messungen für die Adsorptionen auf einer Membran mit 3 Bis/1 β -Cyc/1 2-Hydr

Die Ergebnisse der Selektivitätsmessungen für IgG/HSA sind in Tabelle 5.10 dargestellt. In der Tabelle sind die Adsorptions-, Desorptionskapazitäten der Membranen für IgG und HSA aufgetragen. Hierbei zeigt sich, dass die Kapazitäten der Basismembranen für die beiden Proteine ungefähr gleich sind. Allerdings sind sowohl bei den IgG Messungen als auch bei den HSA Messungen geringe Mengen an Protein von den Basismembranen gewaschen worden. Die Adsorptionskapazitäten der besten Adsorber zeigen für IgG die annähernd gleichen Werte wie in Abbildung 5.41 dargestellt. Bei diesen Membranen liegen die Werte der IgG Adsorption, für die Beschichtungen mit β -Cyc als zweites Monomer im Bereich von 3 mg/ml Membran und für die Werte mit Beschichtungen mit NTA als zweites Monomer liegen die Werte im Bereich von 4,5 mg/ml Membran. Nach der Desorption zeigen beide Versionen der besten Adsorber etwas verringerte Werte. Für die Membranen mit β -Cyc liegen die Werte im Bereich von 2,5 mg/ml Membran und für die Membranen mit NTA bei ca. 3,5 mg/ml Membran. Bei den Adsorptionsmessungen von HSA weisen diese Membranen deutlich geringere Werte auf als für IgG. Für die besten Adsorber liegen die Werte für alle acht Modifizierungen im Bereich von 1,2 – 2 mg/ml Membran.

Gleiche Tendenzen zeigen die Modifizierungen mit den Monomeren 2-Hydr/Bis, 2-Hydr/Bis/ β -Cyc und 2-Hydr/ β -Cyc. Diese Membranen haben IgG Kapazitäten im Bereich von 3 mg/ml Membran. Nach der Desorption zeigen diese Membranen noch eine Kapazität von etwa 2,5 – 2 mg/ml Membran. Diese hohe Kapazität zeigen die Membranen bei den Messungen mit HSA nicht. Hierbei liegen Adsorptionskapazitäten im Bereich von 1,8 - 1 mg/ml Membran. Nach der Desorption zeigen diese Membranen und die besten Adsorber HSA Kapazitäten von etwa 1,7 - 1,2 mg/ml Membran.

Bei den Messungen der konventionellen Ionenaustauscher zeigt nur 2-Hydr/AMPS eine vergleichbare Kapazität für IgG und HSA. Die 2-Hydr/AMPS Membranen weisen hierbei eine Adsorptionskapazität von 5,14 mg/ml Membran sowohl für IgG als auch für HSA auf. Bei der Desorption zeigen sie Werte von 5 mg/ml Membran für IgG und ca. 4,5 mg/ml Membran für HSA. Für die anderen beiden Ionenaustauscher aus 2-Hydr/VS und 2-Hydr/VP sind bei der IgG Adsorption annähernd gleiche Werte gefunden worden. Beide zeigen eine Adsorptionskapazität für IgG von etwa 4 mg/ml Membran und eine Desorptionskapazität von 3,5 mg/ml Membran. Für die Adsorptionen mit HSA zeigt das 2-Hydr/VS mit 2,5 mg/ml Membran etwa doppelt so große Werte wie das 2-Hydr/VP. Nach der Desorption ist der Unterschied mit 1,9 mg/ml Membran zu 1,6 mg/ml Membran nicht mehr so groß. Für alle Messungen ist in etwa die gleiche Abweichung erhalten worden. Bei den Adsorptionsmessungen liegt diese im Bereich von 15% und bei den Desorptionen ist diese kleiner und liegt nur noch bei etwa 10%.

Tabelle 5.10 Ergebnisse der Einzelmessungen für IgG und HSA. Angegeben sind die durchschnittlichen Werte von der Adsorption (Ad.) und der Desorption (De.)

Probe	Ad. IgG [mg / ml Membran]	Ad. HSA [mg / ml Membran]	De. IgG [mg / ml Membran]	De. HSA [mg / ml Membran]
Basis	1,06	1,08	1,01	1,03
3 Bis / 1 β-Cyc / 1 2-Hydr	2,70	1,37	2,59	1,35
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 2-Hydr	3,17	1,28	2,48	1,02
3 Bis / 1 β-Cyc / 1 GAMA	3,69	1,43	3,56	1,48
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 GAMA	2,91	2,01	3,06	1,48
3 Bis / 1 NTA / 1 2-Hydr	4,68	1,51	4,01	1,52
3 Bis / 1 NTA / 6 2-Hydr	4,49	1,42	3,90	1,44
3 Bis / 1 NTA / 1 GAMA	4,45	1,16	3,59	1,35
3 Bis / 1 NTA / 6 GAMA	5,06	1,16	3,40	1,66
2-Hydr / AMPS	5,14	5,14	4,96	4,39
2-Hydr / VP	3,94	1,17	3,34	1,60
2-Hydr / VS	3,75	2,51	3,39	1,90
2-Hydr / Bis / β-Cyc	3,11	1,84	2,46	1,73
2-Hyd / Bis	3,80	1,30	2,32	1,27
2-Hydr / β-Cyc	2,97	0,76	1,74	1,12

Aus den Ergebnissen in Tabelle 5.10 sind dann die Selektivitäten nach Formel (12) berechnet worden. Aus der Formel ergibt sich eine Selektivität für IgG, wenn der α -Wert größer als eins ist. Bei einem Wert von eins ist keine Selektivität festzustellen und bei einem Wert von kleiner eins haben die Membranen eine HSA Selektivität. In der Abbildung 5.46 sind die berechneten Selektivitäten dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass nur die Basismembranen und die mit 2-Hydr/AMPS beschichteten Membranen keine Selektivität aufweisen. Alle anderen Membranen zeigen eine IgG Selektivität. Dabei fällt auf, dass die Selektivitäten der meisten Membranen nach den Adsorptionsmessungen größer sind als nach der Desorption. Die „besten Adsorber“, die NTA als zweites Monomer beinhalten, zeigen dabei die höchsten Adsorptionsselektivitäten. Mit diesen Membranen sind Selektivitäten von 3 - 4 erreicht worden. Nach der Desorption sinken diese Werte recht deutlich auf Selektivitäten von 2,5 ab. Die anderen „besten Adsorber“ zeigen Adsorptionsselektivitäten um 2,5. Der Unterschied zwischen Adsorption und Desorption ist bei diesen Adsorbentien aber deutlich geringer. Die Abweichung zwischen Adsorptionsselektivität und Desorptionsselektivität beträgt nur etwa 0,2 - 0,3. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch die Mischungen aus 2-Hydr/Bis/ β -Cyc und 2-Hydr/VS. Bei diesen Mischungen betragen die Selektivitäten zwischen 1,7 und 1,5. Die Abweichung zwischen Adsorption und Desorption liegen im Bereich von 10%. Die Mischungen 2-Hyd/VP, 2-Hydr/Bis und 2-Hydr/ β -Cyc zeigen auch ein gleiches Verhalten bei den Selektivitäten. Diese Membranen zeigen eine hohe Selektivität von etwa 3 nach der Adsorption. Die Selektivitäten

sinken nach der Desorption jedoch deutlich ab. Die Erreichten α -Werte betragen dann nur noch etwa 2. Da die Abweichungen mittels Fehlerfortpflanzung berechnet worden sind, sind Ergebnisse abhängig von den Abweichungen der einzelnen Messungen, und daher für die Adsorptionen mit etwa 15% größer als für die Desorptionen mit etwa 10%.

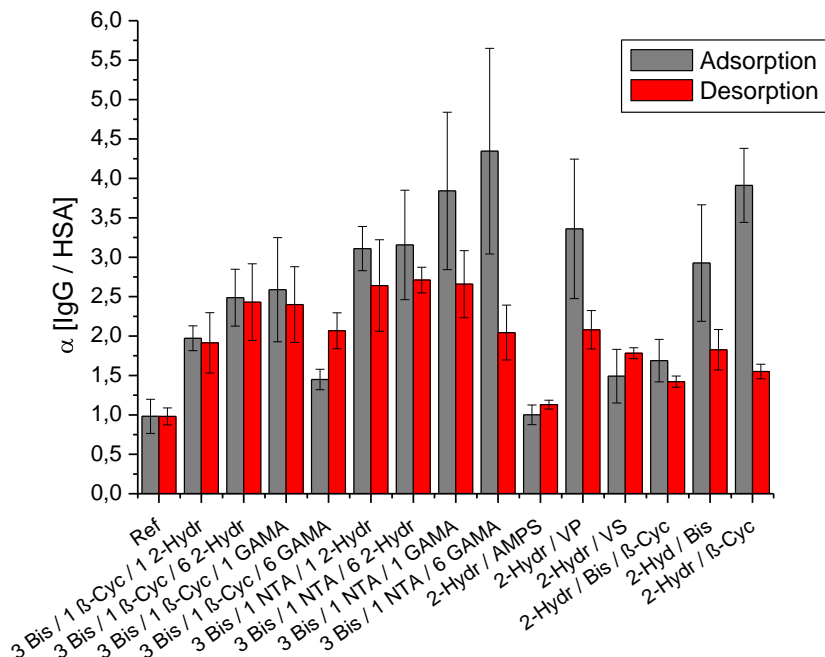


Abbildung 5.46 Berechnete Selektivitäten aus den Ergebnissen in Tabelle 5.10

Auch die Messungen mit Lysozym als Referenzprotein sind genauso durchgeführt worden wie die Messungen mit HSA. Allerdings ist bei diesen Messungen nur eine begrenzte Auswahl an Membranen verwendet worden. Es sind bei diesen Messungen die Basismembranen, die besten Adsorber 3Bis/1 β -Cyc/1 2-Hydr, 3Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr, 3Bis/1 β -Cyc/1 GAMA, 3Bis/1 β -Cyc/6 GAMA und die drei konventionellen Ionenaustauscher vermessen worden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 5.11 aufgetragen.

Die Messungen zeigen, dass die Basismembranen für IgG wieder Kapazitäten von ca. 1 mg/ml Membran aufweisen. Diese Kapazitäten für Lysozym sind mit 1,1 – 1,2 mg/ml Membran etwas größer. Generell zeigen die Basismembranen sowohl für IgG als auch für Lysozym größere Werte nach der Desorption. Diese Abweichung liegt aber im Bereich der Abweichung, welche für die Adsorptionen durchschnittlich 15% und für die Desorptionen 10% beträgt.

Als weitere Membranen sind die besten Adsorber vermessen worden. Bei den besten Adsorbern zeigen sich wieder die bekannten IgG Kapazitäten von 2,5 – 3 mg/ml Membran für die Adsorption und von ca. 2,5 mg/ml Membran für die Desorption. Die Ergebnisse für Lysozym liegen bei der Adsorption im Bereich von 1 - 1,4 mg/ml Membran und für die Desorption im Bereich von 1,3 – 1,5 mg/ml Membran.

Bei den Ionenaustauschern sind auch wieder unterschiedliche Ergebnisse für 2-Hydr/AMPS und 2-Hyd/VS bzw. 2-Hydr/VP erhalten worden. Während die Membranen mit 2-Hydr/AMPS hohe Werte von etwa 5 mg/ml Membran für alle Messungen zeigt, haben die anderen Membranen niedrigere Kapazitäten. Für die Adsorption von IgG zeigen diese Membranen wieder Kapazitäten von 3,3 mg/ml Membran und für die Desorption von 3 mg/ml Membran. Für das Lysozym weisen die Membranen aber deutlich geringere Kapazitäten auf. Die Kapazitäten liegen bei 1,6 mg/ml Membran für die Adsorption von Lysozym und bei 1,3 mg/ml Membran bzw. 1,6 mg/ml Membran für die Desorption. Wie bereits beschrieben zeigen alle Messungen eine ähnliche Abweichung, von 15% für die Adsorption und 10% für die Desorption.

Tabelle 5.11 Ergebnisse der Einzelmessungen für IgG und Lysozym (Lys). Angegeben sind die durchschnittlichen Werte von der Adsorption (Ad.) und der Desorption (De.)

Probe	Ad. IgG [mg / ml Membran]	Ad. Lys [mg / ml Membran]	De. IgG [mg / ml Membran]	De. Lys [mg / ml Membran]
Basis	0,95	1,13	1,10	1,19
3 Bis/ 1 β-Cyc/ 1 2-Hydr	2,31	1,40	2,28	1,35
3 Bis/ 1 β-Cyc/ 6 2-Hydr	2,44	1,43	2,35	1,24
3 Bis/ 1 β-Cyc/ 1 Gama	3,23	1,46	2,63	1,55
3 Bis/ 1 β-Cyc/ 6 Gama	3,49	1,36	2,70	1,53
2-Hydr / AMPS	4,83	5,05	4,77	4,78
2-Hydr / VP	3,21	1,63	3,04	1,30
2-Hydr / VS	3,36	1,67	3,12	1,65

Wie bereits beschrieben sind die Selektivitäten nach Formel (12) Berechnet worden. Auch bei den Lysozym-Messungen ist die IgG-Selektivität wieder größer je größer der α -Wert ist. In der Abbildung 5.47 sind die Ergebnisse der Berechnungen dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen auch hierbei wieder, dass die Basismembranen und die mit 2-Hydr/AMPS beschichteten Membranen keine Selektivität aufweisen. Die Werte dieser Membranen lagen um 1. Allerdings zeigen die Messungen für die Adsorption auf den Basismembranen eine leichte Lysozym Selektivität.

Für die „besten Adsorber“ zeigen sich Unterschiede, abhängig davon, welches „Abstandhalter“-Monomer verwendet worden ist. Die Membranen mit GAMA als Abstandhalter zeigen die höchsten Selektivitäten von 3,0 - 3,5. Allerdings ist dieser

Unterschied nur bei den Adsorptionen zu erkennen. Nach der Desorption haben die „besten Adsorber“ alle die gleiche Selektivität von ungefähr 1,7. Diese Selektivität zeigen die „besten Adsorber“ mit 2-Hydr als „Abstandhalter“-Monomer bereits nach der Adsorption.

Die beiden Ionenaustauscher 2-Hydr/VS und 2-Hydr/VP weisen auch eine IgG Selektivität auf. Die Adsorptions- und Desorptionsselektivitäten liegen hierbei auf etwa demselben Niveau und mit einem Wert von 2 etwas höher als die Selektivität der „besten Adsorber“. Auch bei den Berechnungen zeigt die Abweichung eine starke Abhängigkeit von den Messungen, die in Tabelle 5.11 aufgetragen worden sind. Die Abweichungen für die Adsorptionsmessungen liegen also wieder bei ca. 15% und die der Desorptionsmessungen bei ca. 10%.

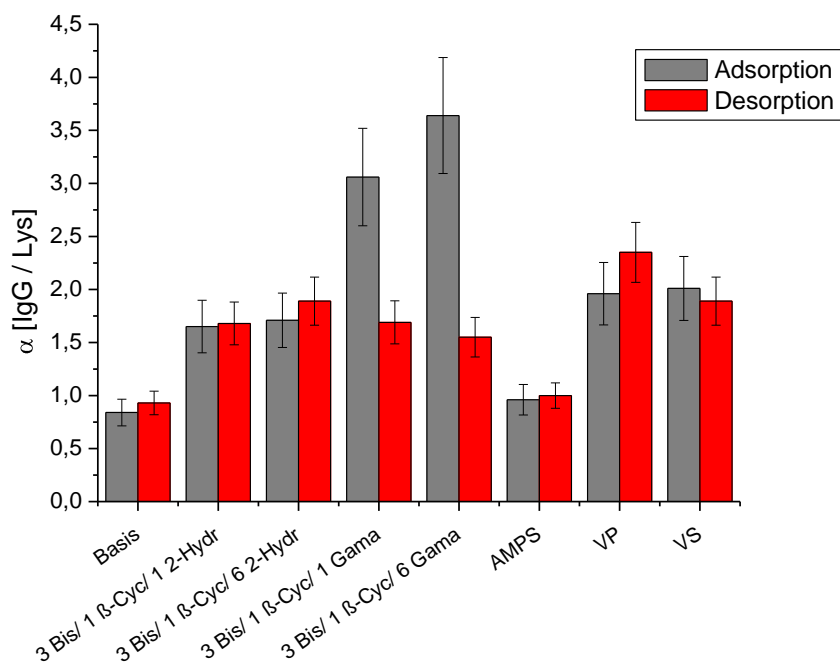


Abbildung 5.47 Berechnete Selektivitäten aus den Ergebnissen in Tabelle 5.11

5.5.3 Mischungsmethode durch GPC analysiert

Bei der Mischungsmethode, die mittels GPC charakterisiert worden ist, sind die Selektivitäten quantitativ analysiert worden. Es liegen sowohl IgG als auch HSA in der Adsorptionslösung vor. Die Durchführung dieser Messungen sind in Abschnitt 4.8.2 (GPC) beschrieben. Bei den Messungen werden dieselben Modifizierungen wie bei den Einzelmessungen (Abschnitt 5.5.2) verwendet. Auch diese Messungen sind als Doppelbestimmung durchgeführt worden. Für die Doppelbestimmung sind jeweils zwei Membranen mit der gleichen Beschichtung zum Einsatz gekommen. Die Kapazitäten von IgG und von HSA sind hierbei über die Flächen im GP-Chromatogramm berechnet worden. Hierzu sind für die Proteine IgG und HSA Eichgraden erstellt worden. Die genaue Erstellung

der Eichgrade ist in Abschnitt 4.8.2 (GPC) beschrieben. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in Tabelle 5.12 aufgetragen.

Im Vergleich zu den Einzelmessungen zeigen sich hierbei durchschnittlich größere Werte bei der Adsorption von beiden Proteinen. Die Desorption zeigt für das IgG größere Desorptionswerte als bei den Einzelmessungen und in den meisten Fällen niedrigere Werte für das HSA. Die Basismembran zeigt bei diesen Messungen Adsorptions-/Desorptionswerte von ca. 3 mg/ml Membran. Diese Werte sind etwa dreimal so hoch wie die bisherigen Ergebnisse für die Basismembranen. Auch die „besten Adsorber“ und die konventionellen Ionenaustauscher 2-Hydr/AMPS und 2-Hydr/VS zeigen etwa doppelt so große Kapazitäten für IgG als bei den vorhergegangenen Messungen. Die anderen Membranen zeigen ähnliche Werte. Auch bei der HSA Adsorption sind deutlich größere Werte detektiert worden als bei den Einzelmessungen. Besonders die konventionellen Ionenaustauscher und die Mischungen aus 2-Hydr/Bis und 2-Hydr/ β -Cyc zeigen deutlich größere Werte. Bei den Desorptionsmessungen von IgG setzt sich diese Tendenz fort. Dabei zeigen alle gemessenen Membranen deutlich größere Werte als bei der Einzelmessmethode. Auch zeigen sich vereinzelt größere Desorptionswerte als Adsorptionswerte. Allerdings liegen die Unterschiede bei diesen Messungen immer im Bereich des Fehlers. Der Fehler bei den IgG Messungen liegt bei 28%.

Für die HSA Desorption sind deutlich verringerte Werte gefunden worden. Die Abnahme an HSA während des Waschvorgangs hat mindestens den Faktor zwei, im Vergleich zu den Einzelmessungen, betragen. Dies ist bei allen gemessenen Membranen der Fall. Ganz deutlich verringerten sich die HSA Mengen bei den „besten Adsorbern“ und den Membranen mit 2-Hydr/Bis, 2-Hydr/Bis/ β -Cyc und 2-Hydr/ β -Cyc. Allerdings zeigt auch der konventioneller Ionenaustauscher 2-Hydr/VS eine ähnliche starke Abnahme an HSA. Die ermittelte Abweichung der HSA Messungen zeigt durchschnittlich einen Wert von 10%.

Tabelle 5.12 Ergebnisse der Mischungsmethode, die für IgG und HSA mittels GPC charakterisiert worden sind. Angegeben sind die durchschnittlichen Werte von der Adsorption (Ad.) und der Desorption (De.)

Probe	Ad IgG [mg / ml Membran]	Ad HSA [mg / ml Membran]	De IgG [mg / ml Membran]	De HSA [mg / ml Membran]
Basis	2,74	1,44	3,42	0,73
3 Bis / 1 β-Cyc / 1 2-Hydr	5,90	2,55	5,57	0,26
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 2-Hydr	6,94	2,90	4,87	0,22
3 Bis / 1 β-Cyc / 1 GAMA	5,80	2,29	4,40	0,25
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 GAMA	5,38	2,44	5,08	0,27
3 Bis / 1 NTA / 1 2-Hydr	4,44	2,20	4,57	0,32
3 Bis / 1 NTA / 6 2-Hydr	7,13	2,63	6,02	0,25
3 Bis / 1 NTA / 1 GAMA	5,48	2,45	5,63	0,35
3 Bis / 1 NTA / 6 GAMA	5,70	1,53	5,50	0,33
2-Hydr / AMPS	9,75	10,35	7,56	5,72
2-Hydr / VP	2,96	4,59	4,53	2,10
2-Hydr / VS	5,48	4,40	4,79	0,36
2-Hydr / Bis / β-Cyc	3,68	2,11	4,45	0,30
2-Hyd / Bis	4,55	3,26	4,98	0,50
2-Hydr / β-Cyc	2,42	3,84	3,66	0,90

Aus den Ergebnissen der Messungen sind wieder wie bereits beschrieben die α -Werte berechnet worden und auch hierbei ist die IgG-Selektivität wieder größer je höher der α -Werte ist. Die so bestimmten Ergebnisse der Mischungsmessungen sind in Abbildung 5.48 aufgetragen.

In der Auftragung zeigt sich ein großer Unterschied zwischen Adsorptions- und Desorptionsmessung. Die Adsorptionsmessungen zeigen keine Selektivität für die Membranen mit den konventionellen Ionenaustauschern und Membranen mit den Beschichtungen 2-Hydr/Bis und 2-Hydr/ β -Cyc. Für die Basismembran und die Membran mit 2-Hydr/Bis/ β -Cyc ist eine geringe IgG Selektivität von 1,75 gefunden worden. Die „besten Adsorber“ zeigen recht hohe IgG Selektivitäten und zwar im Bereich von 2,5 - 3,5.

Die Werte für die Desorption von HSA zeigen dagegen, dass recht große Mengen an HSA bei den meisten Membranen ausgewaschen worden sind, wohingegen so gut wie kein Auswaschen von IgG beobachtet werden konnte. Daher sind deutlich größere Selektivitäten nach der Desorption gefunden worden. Am deutlichsten ist dieser Anstieg für die meisten „besten Adsorber“. Die Selektivitäten dieser Membranen liegen im Bereich von 14 bis 23. Auch die Membranen mit 2-Hydr/Bis, 2-Hydr/Bis/ β -Cyc zeigen einen deutlichen Anstieg der Selektivität auf etwa 14. Allerdings zeigt auch die Membran mit dem konventionellen Ionenaustauscher aus 2-Hydr/VS einen ähnlichen Anstieg. Dieser Anstieg ist nicht erwartet gewesen, da es keine Aminosäure spezifischen Haftgruppen in diesem Polymer gibt. Die

erwartete geringe Selektivität zeigen die Anderen konventionellen Ionenaustauscher-membranen mit 2-Hydr/VP und 2-Hydr/AMPS. Diese Ionenaustauscher zeigen eine Selektivität von 2 und damit haben sie nur eine sehr geringe Selektivität. Die Basismembran und die Membranen mit 2-Hydr/ β -Cyc zeigen Selektivitäten um 4. Der Fehler dieser Berechnungen ist allerdings aufgrund der Fehler in den Messungen recht groß und beträgt sowohl für die Adsorption als auch für die Desorption 38%.

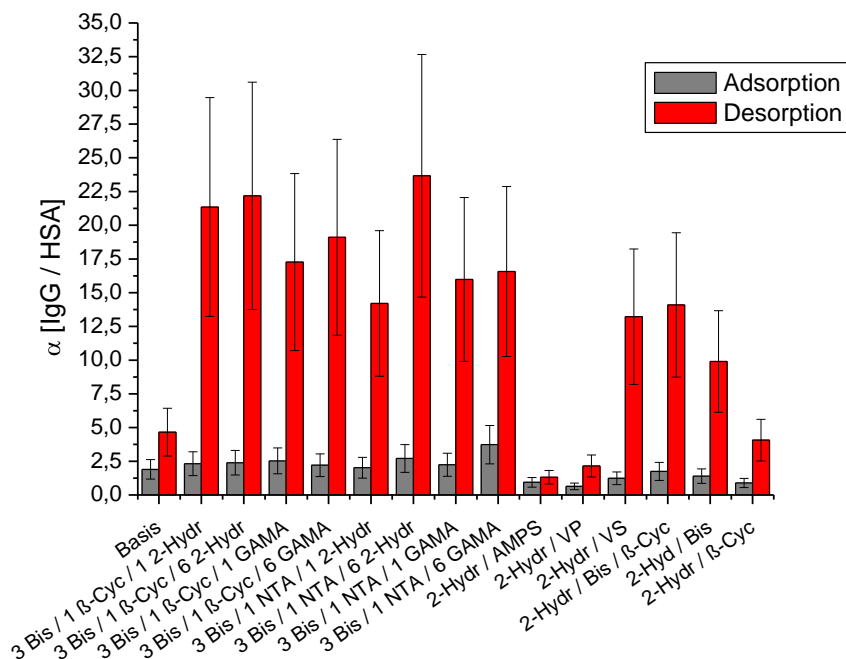


Abbildung 5.48 Berechnete Selektivitäten aus den Ergebnissen in Tabelle 5.12

5.5.4 Dynamische Selektivitäten

Die Durchführung der dynamischen Selektivitätsmessungen ist in Abschnitt 4.8.3 beschrieben. Diese Messungen sind auch wieder nur mit ausgewählten Membranen durchgeführt worden. Die Membran Auswahl ist dabei gleich, wie bei den dynamischen Adsorptionstests (Abschnitt 5.4.4). Die Tests sind mit den Basismembranen, den Membranen mit den konventionellen Ionenaustauscher AMPS, VP und drei der „besten Adsorber“ durchgeführt worden. Wie bereits bei den Abschnitten der statischen Adsorption ist dieser Abschnitt wieder in einen Einzelmessungsteil und einen Mischungsmethodenteil getrennt. Beide Messmethoden sind jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt worden. Bei Einzelmessungsteil sind IgG und HSA jeweils einzeln auf dem Membranstapel adsorbiert und wieder desorbiert worden. Dabei konnte die adsorbierte und desorbierte Menge an Protein über die Fläche der Peaks und einer Eichgrade charakterisiert werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5.13 dargestellt.

Die Werte zeigen, dass die Basismembranen wieder eine Adsorption von ca. 1 mg/ml Membran an IgG aufweisen. Davon sind nach der Desorption noch etwa 80% zurückgewonnen worden. Die HSA Ergebnisse dieser Membran zeigen eine etwas geringere Kapazität von 0,8 mg/ml Membran und eine Rückgewinnung von etwas mehr als 50% des eingesetzten Proteins. Daher sind für diese Membran geringe IgG Selektivitäten von 1,3 für die Adsorption und 1,75 für die Desorption erhalten worden.

Die „besten Adsorber“ zeigen eine deutlich größere Adsorption an IgG von ca. 2,5 mg/ml Membran. Allerdings sind auch hierbei nur etwa 65% des Proteins nach der Desorption zurückerhalten worden. Die Kapazitäten dieser Membranen gegenüber dem HSA sind aber deutlich geringer als für das IgG. Diese Kapazitäten liegen abhängig vom Pfropf-Copolymer zwischen 1,5 – 0,6 mg/ml Membran. Nach der Desorption sind für alle drei „besten Adsorber“ die annähernd gleich Menge an HSA, mit 0,5 mg/ml Membran gefunden worden. Dieser Unterschied in der Kapazität führt zu recht deutlichen IgG Selektivitäten von 1,7 – 3,9 für die Adsorption und 2,2 – 2,8 für die Desorption.

Für den konventionellen Ionenaustauscher aus 2-Hydr/AMPS sind etwa gleiche Adsorptionswerte für IgG und HSA gefunden worden. Die Kapazität dieser Membranen liegt im Bereich von 2,6 mg/ml Membran. Daher zeigen diese Membranen keine Selektivität bei der Adsorption. Bei der Desorption ist aber etwas mehr IgG (1,8 mg/ml Membran) zurückgewonnen worden als HSA (1 mg/ml Membran) und somit ergibt sich eine IgG Selektivität von 1,9. Der andere konventionelle Ionenaustauscher 2-Hydr/VP zeigt eine etwas größere Adsorption an HSA (1,9 mg/ml Membran) als an IgG (1,58 mg/ml Membran) und zeigt damit eine geringe HSA Selektivität. Nach der Desorption sind aber wieder annähernd gleiche Werte von 1 mg/ml Membran gefunden worden. Daher zeigen diese Membranen nach der Desorption keine Selektivität mehr. Die Standardabweichung ist wieder relativ konstant über die einzelnen Messungen und beträgt für die Adsorption 25% und für die Desorption 20%.

Tabelle 5.13 Ergebnisse der dynamischen Einzel-Selektivitätsmessungen. Angegeben sind die durchschnittlichen Werte von der Adsorption (Ad.) und der Desorption (De.) für IgG und HSA

Proben	Ad. IgG [mg / ml Membran]	De. IgG [mg / ml Membran]	Ad. HSA [mg / ml Membran]	De. HSA [mg / ml Membran]	Ad. α [IgG / HSA]	De. α [IgG / HSA]
Basis	1,05	0,78	0,81	0,44	1,29	1,75
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 2-Hydr	2,40	1,50	0,94	0,53	2,56	2,84
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 GAMA	2,18	1,17	0,57	0,53	3,86	2,22
3 Bis / 1 NTA / 6 GAMA	2,54	1,65	1,48	0,59	1,71	2,80
2-Hydr / AMPS	2,68	1,79	2,59	0,95	1,04	1,89
2-Hydr / VP	1,58	1,05	1,93	1,09	0,82	0,96

Bei den Messungen der Mischungsmethode sind beide Proteine gleichzeitig auf der Membran adsorbiert und nach einem Waschvorgang wieder desorbiert worden. Die Besonderheit bei dieser Methode ist, dass nur die desorbierte Lösung aufgefangen werden konnte und dann mittels GPC charakterisiert werden konnte. Die quantitative Bestimmung der Messwerte bezieht sich daher nur auf die Desorption und ist wieder mit Hilfe einer Eichgrade erfolgt. Durch diese konnte von den Peakflächen im GP-Chromatogramm auf die Proteinkonzentration geschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5.14 aufgetragen. Auch bei diesen Messungen ist wieder nur eine begrenzte Auswahl an Membranen vermessen worden. Die Auswahl ist identisch mit der Auswahl der Einzelmessungen.

Bei diesen Messungen zeigen die Basismembranen eine Kapazität von 0,8 mg/ml Membran für IgG und eine von 0,7 mg/ml Membran für HSA. Daraus ergibt sich dann eine geringe IgG Selektivität von 1,15. Für die besten Adsorber konnten deutlich größere Selektivitäten gefunden werden. Dabei zeigen die beiden Adsorber, mit β -Cyc als zweites Monomer, IgG Kapazitäten von ca. 1,2 mg/ml Membran. Die HSA Kapazitäten dieser Membranen sind aber mit nur 0,2 – 0,25 mg/ml Membran deutlich geringer. Die Selektivitäten dieser Membranen ist dadurch 5,8 bzw. 5,0. Der andere beste Adsorber, mit NTA als zweitem Monomer, zeigt eine höhere Kapazität für IgG und HSA. Die IgG Kapazität beträgt dabei 2,2 mg/ml Membran und die HSA Kapazität 0,6 mg/ml Membran. Die resultierende Selektivität beträgt dann 3,6 und ist damit etwas geringer als die Selektivität der anderen beiden besten Adsorber.

Die konventionellen Ionenaustauscher zeigen hingegen etwa gleiche Selektivitäten von 1,5. Dabei zeigen aber dieses Mal die Membranen mit 2-Hydr/VP die größeren Kapazitäten. Diese beträgt 1,7 mg/ml Membran für IgG und 1,1 mg/ml Membran für HSA. Die 2-Hydr/AMPS beschichteten Membranen zeigen dagegen eine etwas geringere Kapazität von 1,3 mg/ml Membran für IgG und 0,9 mg/ml Membran für HSA. Auch bei diesen Messungen ist ein konstanter Fehler von 12.5% ermittelt worden.

Tabelle 5.14 Ergebnisse der dynamischen in Situ Selektivitätsmessungen, die mittels GPC Charakterisiert wurden. Angegeben sind die durchschnittlichen Werte von der Desorption (De.) für IgG und HSA

Probe	De. IgG [mg / ml Membran]	De. HSA [mg / ml Membran]	α [IgG/HSA]
Basis	0,79	0,69	1,15
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 2-Hydr	1,19	0,20	5,83
3 Bis / 1 β-Cyc / 6 GAMA	1,24	0,25	5,03
3 Bis / 1 NTA / 6 GAMA	2,21	0,61	3,60
2-Hydr / AMPS	1,32	0,86	1,53
2-Hydr / VP	1,72	1,14	1,51

5.6 Verbesserung der Kapazität

5.6.1 Variation der Pfropfbedingungen

Zur Verbesserung der Kapazität der Membranen ist versucht worden, die Menge an Polymer auf der Membranoberfläche zu erhöhen. Zur Erhöhung der Polymermenge sind sowohl die Monomerkonzentrationen als auch die UV-Belichtungszeiten variiert worden. Diese Variationen sind jeweils mit dem Monomer 2-Hydr, als auch mit dem „besten Adsorber“ aus 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr durchgeführt worden. Bei der Variation der eingesetzten Monomerkonzentration ist auch noch der beste Adsorber 3 Bis/1 β -Cyc/6 GAMA verwendet worden. Die Ergebnisse dieser Tests wurden in Abbildung 5.49 aufgetragen. Abbildung 5.49 a) zeigt die Abhängigkeit der Polymerisation mit dem Monomer 2-Hydr von der Monomerkonzentration.

Für die ersten beiden Monomerkonzentrationen 100 g/L und 175 g/L ergeben sich noch annähernd die gleichen Ergebnisse. Diese liegen im Bereich von 1,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis 1,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und sind abhängig von der Photoinitiatordichte. Für die Konzentration von 200 g/L steigen die Werte auf 2,1 – 2,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Diese Werte sind weiter gestiegen, wenn die Konzentrationen auf 300 g/L bzw. auf 600 g/L erhöht worden ist. Der Anstieg bei diesen Konzentrationen ist sehr deutlich. Bei 300 g/L sind DG-Werte von 6,4 – 7,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhalten worden. Bis zu dieser Konzentration ist auch noch ein Einfluss der Photoinitiatordichte zu

erkennen gewesen. Allerdings ist dieser Effekt aufgrund des hohen DG-Werts bei 600 g/L in Abbildung 5.49 a) nur schwer zu erkennen. Wie schon erwähnt sind für 600 g/L Monomerkonzentration deutlich größere DG-Werte erreicht worden. Diese DG-Werte liegen alle um $27,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und es ist kein Einfluss der Photoinitiatordichte mehr zu erkennen gewesen.

Für die beiden „besten Adsorber“ ist die Abhängigkeit von der Monomerkonzentration in Abbildung 5.49 b) gezeigt. Die Tests sind hierbei nur mit einer Photoinitiatordichte und nur bei den Konzentrationen von 100 g/L, 200 g/L und 300 g/L durchgeführt worden. Diese Membranen zeigen bei 100 g/L DG-Werte von $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und damit dieselben Werte wie bei den vorherigen Messungen. Bei einer Verdopplung der Monomerkonzentration auf 200 g/L sind die DG-Werte deutlich größer. Hierbei sind DG-Werte von bis zu $0,65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht worden. Eine weitere Erhöhung der Monomerkonzentration führt aber nicht zu einem noch höheren DG-Wert. Die DG-Werte für 300 g/L liegen mit $0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sogar unter den Ergebnissen für eine Konzentration von 200 g/L. Bei diesen Messungen sind wieder jeweils drei Membranen pro Messung verwendet worden, und es zeigt sich, dass die Standardabweichung wieder über die einzelnen Membranen konstant ist. Diese liegt für die Adsorber mit 2-Hydr als „Abstandhalter“ bei 22% und für GAMA als „Abstandhalter“ bei 22,5%.

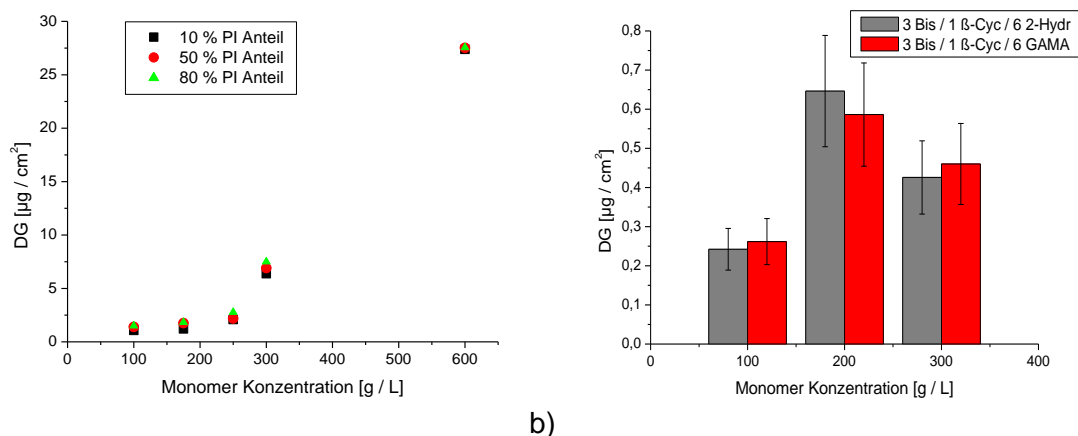


Abbildung 5.49 Variation der Pfropfdichte in Abhängigkeit von Monomer Konzentration. a) Monomer 2-Hydr bei verschiedenen Photoinitiator Dichten. b) Die zwei der „besten Adsorber“ bei einem PI Anteil von 50%.

Als nächstes ist die Abhängigkeit des DG-Werts von der UV-Belichtungszeit getestet worden. Hierzu sind die Membranen mit 2-Hydr bzw. 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr modifiziert worden. Dabei ist ein Photoinitiatoranteil von 50% verwendet worden. Es ist eine Monomerkonzentration von 100 g / L verwendet worden und die Belichtung ist zwischen 10 min und 120 min variiert worden.

Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 5.50 aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass die Variation der Belichtungszeit auf die Polymerisation des Monomer 2-Hydr einen größeren Einfluss hat als auf die Polymerisation des „besten Adsorbers“. Für das Monomer 2-Hydr ist eine fast lineare Abhängigkeit zwischen DG-Wert und UV-Zeit gefunden worden. Eine Abweichung vom linearen Verlauf zeigt sich dabei bei 20 min und der Anstieg flacht bei 120 min etwas ab.

Die Monomermischung des „besten Adsorbers“ zeigt keinen deutlichen linearen Anstieg wie das 2-Hydr. Diese Monomermischung zeigt bei 10 min und 20 min fast die gleichen DG-Werte. Ein Anstieg ist dann bei 30min und 60 min zusehen. Bei einer weiteren Verdopplung der UV-Zeit verringert sich aber der DG-Wert um eine Abweichung von 20%.

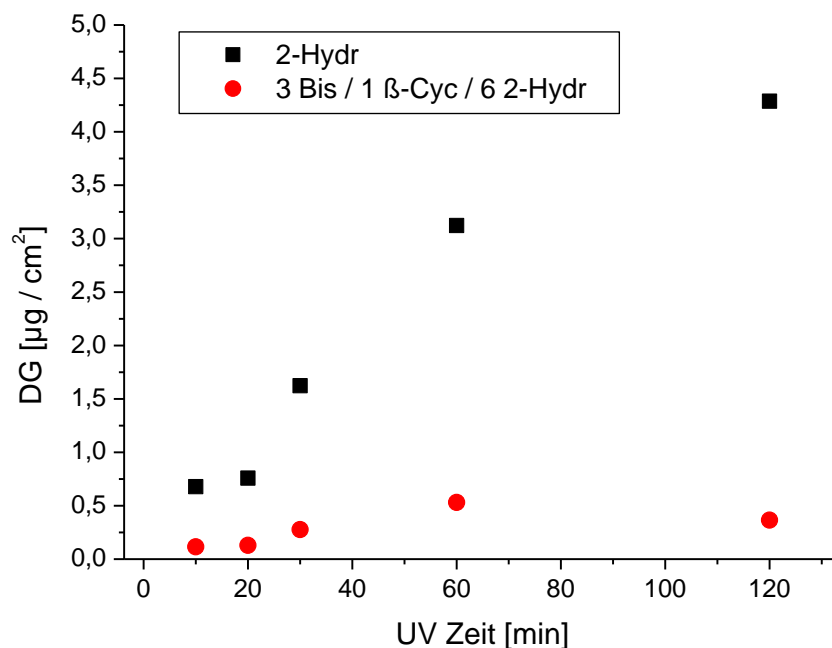


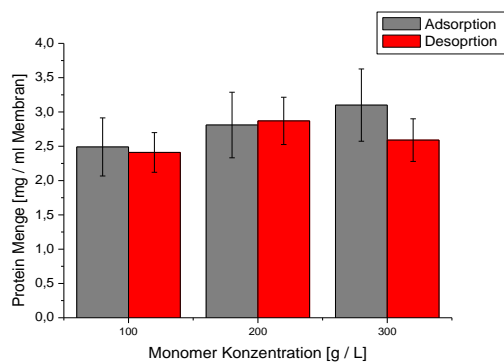
Abbildung 5.50 Variation des Pfropfungsgrads in Abhängigkeit von der UV-Belichtungszeit. Darstellung des Unterschieds zwischen 2-Hydr und dem „besten Adsorber“ 3 Bis / 1 β-Cyc / 6 2-Hydr.

Für die Membranen, die mit dem „besten Adsorber“ 3 Bis/1 β-Cyc/6 2-Hydr modifiziert worden sind, sind noch IgG Adsorptions-/Desorptionsmessungen durchgeführt worden. Bei diesen Messungen ist die statische Adsorptionsmethode (Abschnitt 4.7.1) zur Anwendung gekommen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 5.51 a) und b) dargestellt. In Abbildung 5.51 a) werden die Ergebnisse für die unterschiedlichen Monomerkonzentrationen gezeigt.

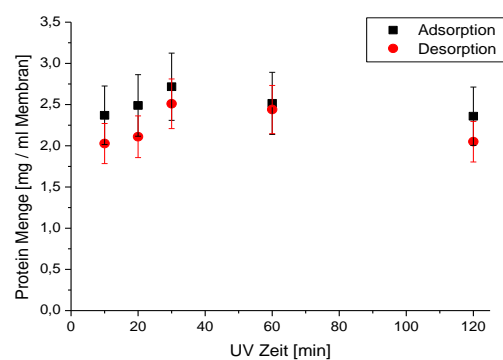
Die Ergebnisse der Adsorptionen liegen bei diesen Messungen im Bereich von 2,5 – 3 mg/ml Membran. Auch bei der Desorption sind keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen

Modifizierungen gefunden worden. Die Ergebnisse dieser Messungen liegen mit Werten zwischen 2,4 mg/ml Membran und 2,9 mg/ml Membran sogar noch näher zusammen. Die Abweichung der Ergebnisse ist dabei im Bereich des Messfehlers. Dieser beträgt für die Adsorptionen 17% und für die Desorptionen 12%. Zusätzlich entsprechen die Ergebnisse den vorherigen Adsorption-, Desorptionsergebnissen.

Dieses ändert sich auch nicht durch die Variation der UV-Zeit in Abbildung 5.51 b). Die Variation der UV-Zeit führt zu Adsorptionen zwischen 2,4 mg/ml Membran für 10 min UV-Zeit und 2,7 mg/ml Membran für 30 min. Die Ergebnisse der anderen Belichtungszeiten liegen genau dazwischen. Auch bei der Desorption ist kein großer Unterschied zwischen den Membranen erkennbar. Alle Membranen verlieren durch den Waschvorgang etwas Protein. Dies führt zu Ergebnissen zwischen 2,0 mg/ml Membran für 10 min, 120 min und 2,5 mg/ml Membran für 30 min UV-Zeit. Die Abweichung zwischen den einzelnen UV-Zeiten liegt auch hierbei wieder im Bereich des Messfehlers der einzelnen Messungen. Dieser beträgt bei der Adsorption 15% und bei der Desorption 12%.



a)



b)

Abbildung 5.51 Ergebnisse der Protein Adsorption / Desorption nach Variation der Pfropfdichte. a) Variation mittel Monomer Konzentration. b) Variation mittel UV-Belichtungszeit. Pfropf-Polymerisation bei 50% PI Anteil mit 3 Bis / 1 β -Cyc / 6 2-Hydr.

5.6.2 „Kamm ähnliche“-Strukturen

Mit den „Kamm ähnlichen“-Strukturen ist weiter versucht worden, die Kapazitäten der „besten Adsorber“ zu erhöhen. Die Durchführung dieser Polymerisationen ist in Abschnitt 4.3.3 beschrieben. Dabei ist zuerst ein „Rückgrat“-Polymer auf die Membran aufgebracht worden. Auf diesem Polymer ist dann noch einmal eine Photoinitiator Immobilisierung erfolgt. An dieses „Rückgrat“-Polymer sind im Anschluss funktionale Polymere, wie die „besten Adsorber“, gepfropft worden. Die Ergebnisse der „Rückgrat“-Pfropfung sind in Abbildung 5.52 aufgetragen.

Die „Rückgrat“-Polymere werden aus den Monomeren 2-Hydr, HEMA und HEMA/DMAPAA aufgebaut. Für die Monomere HEMA und HEMA/DMAPAA sind UV-Belichtungszeiten von 10 min und 30 min gewählt worden. Beim 2-Hydr Monomer ist die Pfropfung nur bei 30 min UV-Zeit erfolgt. Die DG-Werte für das Monomer 2-Hydr zeigen den bereits bekannten Verlauf. Bei einem geringen Photoinitiatoranteil auf der Oberfläche wird ein DG-Wert von $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhalten. Dieser steigt bei Erhöhung des Photoinitiatoranteils kontinuierlich bis auf $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an. Dieser Anstieg ist für die meisten anderen Monomere auch zu beobachten. Als Ausnahme zeigt sich HEMA bei einer Belichtungszeit von 10 min. Dieses zeigt einen geringen DG-Wert von $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei einem Photoinitiatoranteil von 10% und 50%. Der DG-Wert steigt dann bei einem Anteil von 80% sprunghaft auf $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an. Die Reaktion mit HEMA und einer Belichtungszeit von 30 min hat die höchsten DG-Werte ergeben. Diese steigen von $5,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $8,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an. Allerdings ist bei diesen Membranen auch die größte Abweichung mit 18% gefunden worden.

Die Monomermischungen aus HEMA/DMAPAA sind verwendet worden, um sowohl ein Polymer mit OH-Gruppen auf der Membranoberfläche zu haben, als auch eine partiell positive Ladung einzuführen. Diese Ladung sollte dazu dienen, Bis-Monomere an der Membranoberfläche zu akkumulieren und dadurch die Polymerisation der „besten Adsorber“ zu erleichtern. Bei den Mischungen HEMA/DMAPAA sind bei 10 min UV-Belichtungszeit DG-Werten zwischen $0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $1,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhalten worden. Für 30 min Belichtungszeit liegen die DG-Werte höher, und zwar im Bereich von $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis $3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Bei diesen Membranen zeigt sich zusätzlich nur noch ein sehr geringer Anstieg des DG-Wertes bei der Erhöhung des Photoinitiatoranteils von 50% auf 80%. Die Abweichung der Messungen liegt für 2-Hydr und HEMA/DMAPAA 30 min bei 15% und für HEMA 10 min und HEMA/DMAPAA 10 min liegt sie bei 13%.

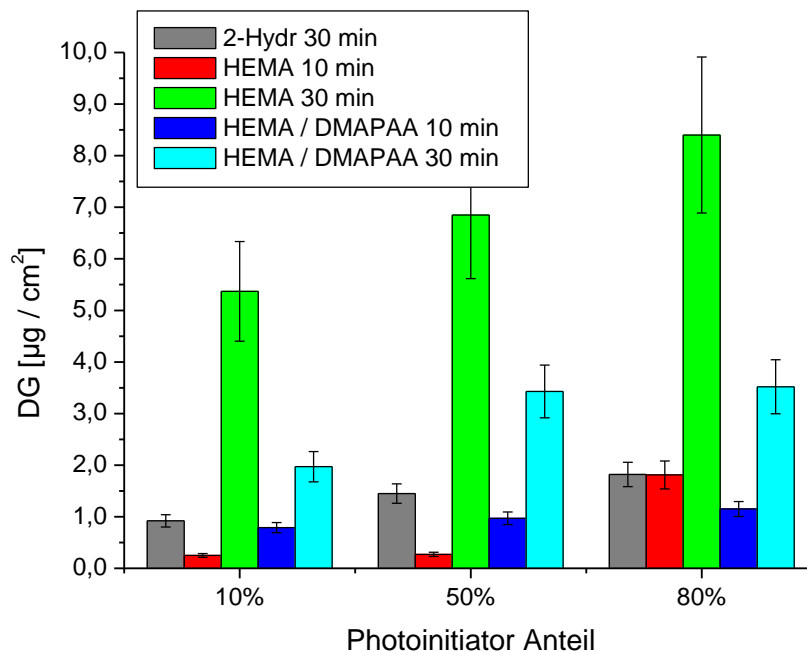


Abbildung 5.52 Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen für die „Rückgrat“-Polymere. Mit UV-Belichtungszeiten von 10 min und 30 min.

Nach dem Pfropfen der „Rückgrat“-Polymere ist auf diese erneut Photoinitiator aufgebracht und die Membranen sind mit dem „besten Adsorber“ 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr gepfropft worden. Für diese Tests ist wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben ein Photoinitiatoranteil von 50% verwendet worden. Die Ergebnisse dieser Pfropfungen sind in Abbildung 5.53 aufgetragen. Diese Abbildung zeigt die Erhöhung des DG-Werts in Abhängigkeit vom „Rückgrat“-Polymer. Als Referenz ist in dieser Auftragung der DG-Wert vom „besten Adsorber“, gepfropft auf die Basismembranen, verwendet worden.

Diese Referenz zeigt einen DG-Wert von $0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dieser Wert konnte durch das Einführen von „Kamm ähnlichen“-Strukturen deutlich erhöht werden. Allerdings konnte diese Erhöhung nur für einige „Rückgrat“-Polymere beobachtet werden. Die Pfropf-Polymerisation auf 2-Hydr führt zu annähernd gleichen DG-Werten, wie das Pfropfen auf die Basismembran. Wenn HEMA als „Rückgrat“-Polymer verwendet worden ist, zeigen sich unterschiedliche Tendenzen. Bei den Membranen, die nur 10 min mit UV Belichtet worden sind, konnte für alle drei „Rückgrat“-Polymere eine Erhöhung ermittelt werden. Es zeigt aber auch, je größer der DG-Wert des „Rückgrat“-Polymers, desto kleiner ist die Erhöhung des DG-Werts für den „besten Adsorber“ ausgefallen. Für die kleinen DG-Werte ist eine Erhöhung von Faktor drei festgestellt worden, während für den höheren DG-Wert nur noch eine Erhöhung von etwa 40% zu finden ist. Dieser Trend zeigt sich auch, wenn das HEMA-„Rückgrat“ nach 30 min UV Belichtungszeit betrachtet worden ist. Dieses zeigt sogar kleinere DG-Werte als die

Referenz. Besonders groß ist der Unterschied bei Photoinitiatoranteilen von 50% und 80%. Bei einem Photoinitiatoranteil von 10% ist der DG-Wert gleich dem der Referenz.

Die „Rückgrat“-Polymere aus HEMA/DMAPAA zeigen diese Tendenzen nicht. Hierbei sind für die Membranen, bei denen das „Rückgrat“-Polymer nur 10 min belichtet worden ist, durchweg kleiner DG-Werte erhalten worden als bei der Referenz. Für die längere Reaktionszeit von 30 min ist aber eine deutliche Erhöhung des DG-Werts festgestellt worden. Diese Membranen zeigen aber auch keine Tendenzen. Bei dem Polymer, das mit einem Photoinitiatoranteil von 10% gepfropft worden ist, konnte keine Erhöhung des DG-Werts ermittelt werden. Bei den anderen beiden Membranen ist aber eine starke Erhöhung detektiert worden. Diese Erhöhung ist bei dem „Rückgrat“-Polymer, das mit einem Photoinitiatoranteil von 50% gepfropft worden ist, am höchsten. Die Erhöhung beläuft sich hierbei etwa auf den Faktor fünf. Für die Membranen, welche mit einem Photoinitiatoranteil von 80% gepfropft worden sind, liegt die Erhöhung des DG-Werts nur bei einem Faktor von zwei. Die Standardabweichung der Messungen liegen auf einem durchweg konstanten Niveau von 14% - 16 %.

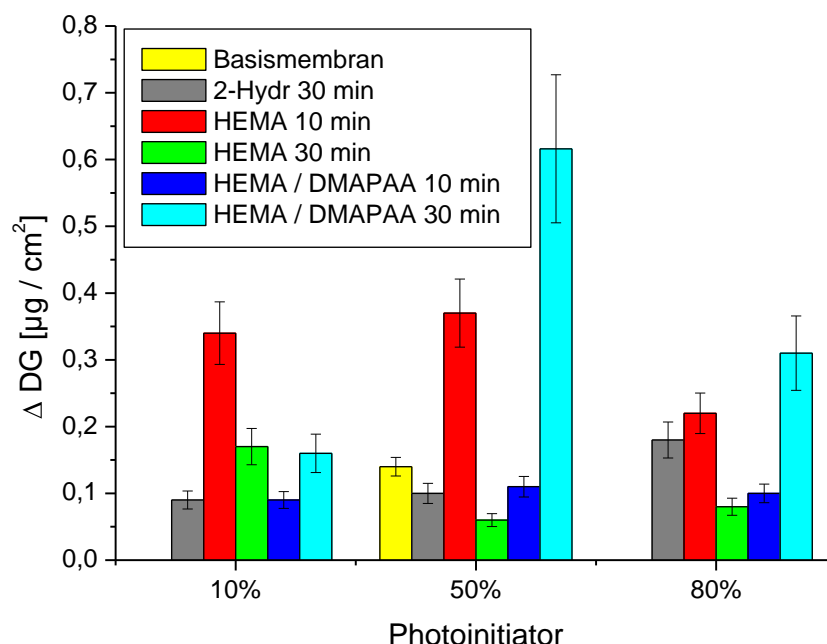


Abbildung 5.53 Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen auf den „Rückgrat“-Polymere bzw auf der Basismembran. Mit UV-Belichtungszeiten von 10 min und 30 min. Pfropfpolymerisation mit 3 Bis / 1 β -Cyc / 6 2-Hydr.

Zum Abschluss dieser Versuchsreihe ist noch der Einfluss des DG-Werts auf die IgG Adsorption/Desorption untersucht worden. Auch bei dieser Untersuchung ist die Durchführung mittels statischer Adsorption (Abschnitt 4.7.1) erfolgt. Bei diesen Tests sind

jeweils drei Membranen mit demselben „Kamm ähnlichen“-Aufbau vermessen worden. Diese Membranen sind dabei so aufgebaut gewesen wie zuvor beschrieben. Zusätzlich dazu dient die Basismembran mit dem „besten Adsorber“ 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr wieder als Referenz. Die Ergebnisse der Adsorptions-/Desorptionsmessungen zeigen eine Rückgewinnung von durchschnittlich 95% des adsorbierten Proteins. Daher sind zur besseren Übersichtlichkeit nur Ergebnisse nach der Desorption in Abbildung 5.54 aufgetragen.

Dabei zeigt sich, dass die Erhöhung des DG-Werts zu keiner Erhöhung des adsorbierten/desorbierten Proteins führt. Ähnliche Adsorptions-/Desorptionswerte, wie die der Referenz, sind nur von den Membranen erreicht worden, die 2-Hydr als „Rückgrat“-Polymer hatten. Allerdings auch nur bei einem Photoinitiatoranteil von 10% bzw. 50%. Auch mit HEMA als „Rückgrat“-Polymer, bei einer Belichtungszeit von 10 min und einer Photoinitiatoranteil von 50%, konnte eine gleiche Adsorptionsfähigkeit wie die der Referenz erreicht werden. Alle anderen Mischungen zeigen eine geringere Adsorptionsfähigkeit. Für HEMA als „Rückgrat“-Polymer liegen alle anderen Desorptionswerte in Bereich von 1 – 1,5 mg/ml Membran. Auch die Membranen mit HEMA/DMAPAA zeigen eine durchweg geringere Kapazität. Für die meisten dieser Membranen liegt die Kapazität im Bereich von 0,5 mg/ml Membran. Nur für die Membranen, die bei einem Photoinitiatoranteil von 50% und 30 min UV-Zeit gepropft worden sind, ist die Kapazität mit 1,5 mg/ml Membran etwa dreimal größer als bei den restlichen Membranen mit HEMA/DMAPAA als „Rückgrat“-Polymer. Für diese Messungen ist ein Fehler von 16% bis 19% ermittelt worden.

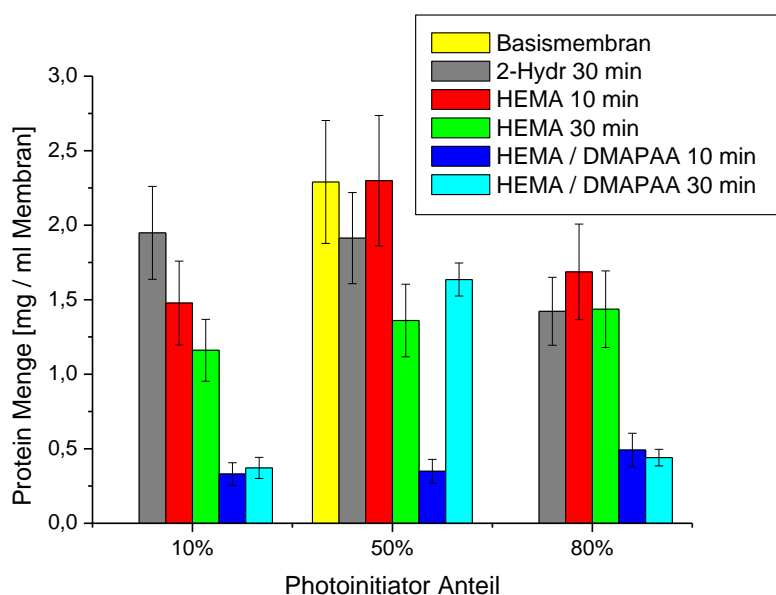


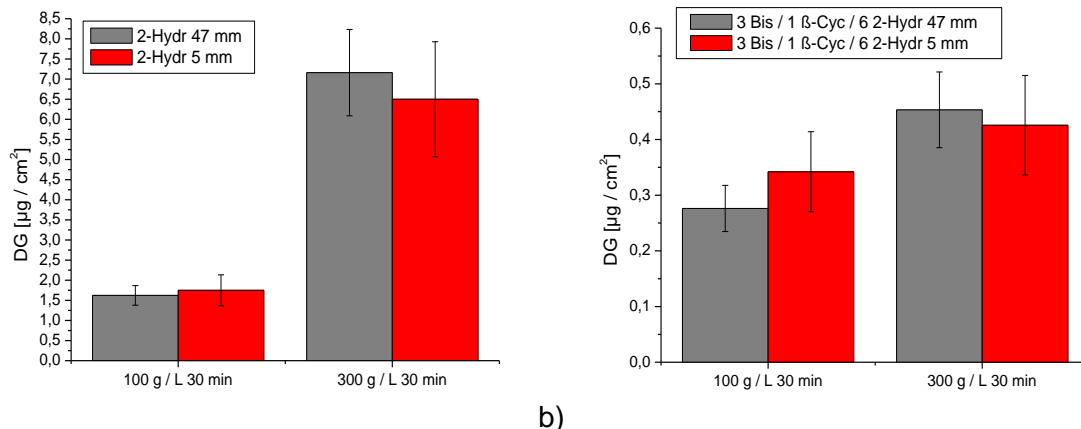
Abbildung 5.54 Ergebnisse der Protein Adsorptions-/Desorptionsmessungen auf den „Kamm ähnlichen“-Polymeren. Auftragung der Desorptionsergebnisse. Pfropfpolymerisation mit 3 Bis / 1 β -Cyc / 6 2-Hydr auf den Unterschiedlichen „Rückgrat“-Polymeren.

5.6.2 Titerplatten-Prozedur

Mit der Titerplatten-Prozedur ist der Einfluss des Membrandurchmessers auf die Pfropf-Polymerisationen untersucht worden. Außerdem sollte diese Methode Anwendung bei Screening-Test finden, da viele mögliche Modifizierungen in nur einem Schritt durchgeführt werden konnten. Die Pfropf-Polymerisation in den Titerplatten ist in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen in den Titerplatten sind in Abbildung 5.55 aufgetragen. Diese Abbildungen vergleichen zusätzlich noch die Ergebnisse der 5 mm Membranen mit denen der 47 mm Membranen. Die Ergebnisse der 5 mm Membranen sind aus den Modifizierungen von jeweils acht Membranen bestimmt worden. Acht Membranen sind notwendig, damit die Änderung im Gewicht der Membranen größer gewesen ist als der Fehler der Waage. Die Membranen sind dabei jeweils mit einer Monomerkonzentration von 100 g/L und 300 g/L und 30min UV-Zeit modifiziert worden. Als Monomer ist zum einen 2-Hydr verwendet worden und zum anderen der beste Adsorber 3 Bis/1 β -Cyc/6 2-Hydr.

Bei den Messungen mit dem Monomer 2-Hydr sind sowohl für 100 g/L als auch für 300 g/L annähernd gleiche DG-Werte bei den 47 mm und den 5 mm Membranen gefunden worden. Bei der Konzentration von 100 g/L liegen die DG-Werte der 47 mm Membranen bei 1,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und für die 5 mm Membranen bei 1,75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Auch für die Monomerkonzentration 300 g/L sind die DG-Werte mit 7,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für 47 mm Membranen und 6,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für die 5 mm Membranen ähnlich. Die Abweichungen zwischen den 5 mm Membranen und den 47 mm Membranen sind dabei deutlich kleiner als die Abweichung über die einzelnen Messungen. Diese beträgt 15% bei den 47 mm Membranen und 22% bei den 5 mm Membranen.

Dieselben Trends sind auch bei den Modifizierungen mit dem „besten Adsorber“ gefunden worden. Die DG-Werte sind hierbei wie erwartet kleiner als bei den Modifizierungen mit 2-Hydr und liegen im Bereich zwischen 0,25 – 0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Für 100 g/L Monomerkonzentration sind auf den 47 mm Membranen DG-Werte um 0,27 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ gefunden worden und für die 5 mm Membranen sind Werte von 0,34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhalten worden. Bei der hohen Konzentration von 300 g/L zeigt sich der umgekehrte Trend. Hierbei zeigen die 47 mm Membranen mit 0,45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ einen etwas größeren DG-Wert als die 5 mm Membranen mit 0,42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Aber auch bei diesen Modifizierungen sind die Abweichungen zwischen den 5 mm und den 47 mm Membranen im Bereich des Fehlers. Dieser beträgt wieder 15% bei den 47 mm Membranen und 21% bei den 5 mm Membranen.



a) b)
Abbildung 5.55 Vergleich der DG-Werte auf den 47 mm und den 5 mm Membranen. a) Ergebnisse der Messungen mit 2-Hydr als Monomer, b) Ergebnisse der Messungen mit 3 Bis / 1 β-Cyc / 6 2-Hydr als Monomer. PI Anteil betrug 50%.

Im Anschluss an die Pfropf-Polymerisationen sind von den Membranen, welche mit den „besten Adsorbern“ modifiziert worden sind, die IgG Kapazität bestimmt worden. Die Bestimmung ist mittels statischer Adsorption erfolgt (Abschnitt 4.7.1). Allerdings sind die Mengen an Protein-, Wasch- und Desorptionslösung auf die kleinen Membranen angepasst worden. Für die Adsorption 8 µg Protein pro Membran, in 150 µl HEPES-Puffer 25 mM gelöst, verwendet worden. Der Waschvorgang ist zweimal mit 300 µl HEPES-Puffer 25 mM und die Desorption ist mit 150 µl HEPES-Puffer mit 1M NaCl erfolgt. Die vermessenen Membranen sind bei einer Monomerkonzentration von 100 g/L, einem Photoinitiatoranteil von 50% und 30 min UV-Zeit funktionalisiert worden. Im Gegensatz zu den Pfropf-Polymerisationen konnte hierbei jede Membran einzeln gemessen werden. Diese Messung ist mittels Micro BCA Protein Assay erfolgt. Für die Ergebnisse sind jeweils acht 5 mm Membranen pro Beschichtung vermessen worden und mindestens drei 47 mm Membranen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.56 aufgetragen. In dieser Abbildung findet auch ein Vergleich der Ergebnisse für die 5 mm und für die 47 mm Membranen statt. Als Ergebnis für die Basismembranen sind dabei gleiche Werte für die 5 mm und 47 mm Membranen gefunden worden. Die Adsorptionswerte dieser Membranen liegen bei 1,15 mg/ml Membran und die Desorptionswerte bei 1,1 mg/ml Membran. Bei den „besten Adsorbern“ liegen die Ergebnisse der 5 mm Membranen immer etwas unterhalb der Ergebnisse für die 47 mm Membranen. Dabei zeigen die 47 mm Membranen eine durchschnittliche Adsorption von 2,60 µg/ml Membran, während die 5 mm Membranen eine durchschnittliche Adsorption von 2,35 µg/ml Membran aufweisen. Auch bei der Desorption ist diese Tendenz zu erkennen. Hier zeigen die 47 mm Membranen mit einer durchschnittlichen desorbierten Proteinmenge von 2,55 µg/ml Membran einen größeren Wert als die 5 mm Membranen mit 2,11 µg/ml Membran.

Allerdings liegen diese Abweichungen zwischen den Membranen im Bereich des Messfehlers. Dieser beträgt für die 47 mm Membran 18% bei der Adsorption und 15% bei der Desorption. Der Messfehler ist für die 5 mm Membranen größer und beträgt für die Adsorption 22% und für die Desorption 20%.

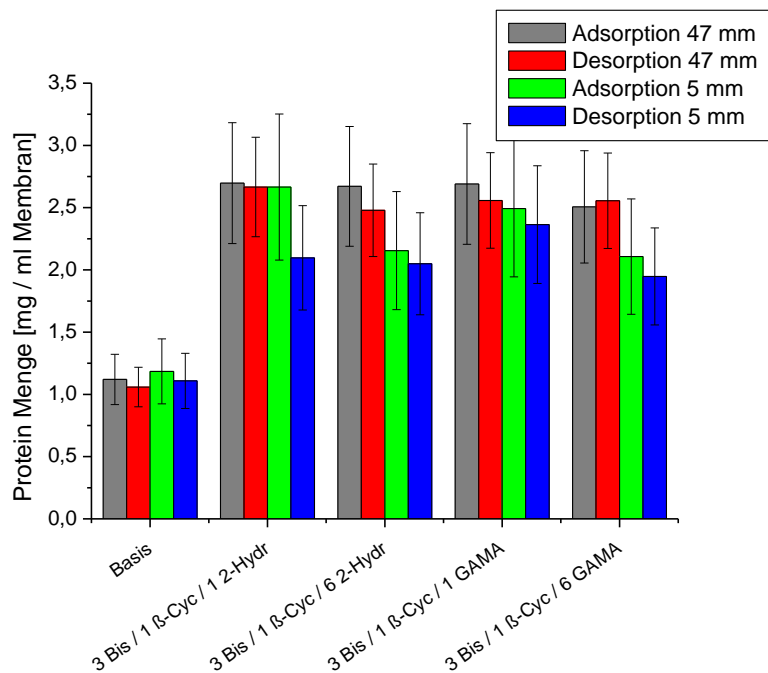


Abbildung 5.56 Ergebnisse der Protein Adsorption / Desorption auf den 47 mm und den 5 mm Membranen. Pfropf-Polymerisation mit den „besten Adsorbern“ bei 50% PI Anteil

5.7 Molekular geprägte Polymere

Die molekular geprägten Polymere sind als zweite Möglichkeit verwendet worden, um proteinselektive Membranen herzustellen. Diese Polymere sind in dieser Arbeit nur auf Cellulosemembranen gepfropft worden, um damit Membranadsorber mit einer möglichst hohen Kapazität zu erhalten.

5.7.1 Pfropf-Polymerisation

Die Herstellung der MIPs ist wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben erfolgt. Dabei sind die molekular geprägten Polymere auf zwei Arten hergestellt worden. Die erste Art sind MIPs, die mit dem Protein IgG in der Reaktionslösung hergestellt worden sind. Die andere Art von MIPs sind Epitop MIPs. In der Reaktionslösung dieser MIPs ist nicht das Protein IgG enthalten, sondern nur ein Peptid. Dieses Peptid stellt einen Teil des IgG da, an dem das Polymer binden soll. Dabei handelt es sich um das Peptid T10 (Abb. 4.6). Als Referenz sind noch „nicht geprägten Polymere“ (NIPs) hergestellt worden. Dazu sind die Polymerisationen wie bei den MIPs erfolgt, allerdings ist hierbei kein Protein oder Peptid in die

Reaktionslösung gegeben worden. Diese sogenannten „nicht geprägten Polymere“ (NIPs) sind das Referenzmaterial. Die Pfropf-Polymerisation ist dabei mit einer Monomerkonzentration von 210 mM und einer UV-Belichtungszeit von 10 min und 30 min durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.57 dargestellt. Jedes Ergebnis ist wieder aus den einzelnen Messungen von mindestens drei Membranen berechnet worden. Die Modifizierung der drei Membranen ist dabei auf die gleiche Art erfolgt. Die ermittelten DG-Werte zeigen dabei alle eine starke Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte und von der verwendeten UV-Zeit. Dabei zeigt sich, dass eine höhere Photoinitiatordichte genau wie eine längere UV-Zeit zu einem starken Anstieg des DG-Werts führt. Bei den NIP Membranen zeigt sich das, indem der DG-Wert für 10 min UV-Zeit von $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $1,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ansteigt. Bei einer Verlängerung der UV-Zeit bleibt diese Tendenz erhalten, aber der DG-Wert ist schon von Anfang an größer. Bei 30 min UV-Zeit steigt der DG-Wert, in Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte, von $1,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $2,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an. Für die molekular geprägten Polymere mit IgG sind die Tendenzen die gleichen wie für die nicht geprägten Polymere. Bei 10 min UV-Zeit zeigen diese Polymere noch geringere DG-Werte als die NIPs. Die DG-Werte liegen dabei zwischen $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Für die längere UV-Zeit von 30min steigen die DG-Werte dieser Membranen deutlich an. Dabei sind dann DG-Werte zwischen $1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erhalten worden.

Die Membranen, die nach dem Epitop Verfahren modifiziert worden sind, zeigen dagegen keine Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte. Da die Verfügbarkeit des Peptids T10 begrenzt ist, sind diese Membranen erst nach vollständiger Charakterisierung der MIPs mit IgG hergestellt worden. Aus diesem Grund sind bei diesen Membranen die Pfropf-polymerisationen nur bei 30 min UV-Zeit und den zwei hohen Photoinitiatordichten 50% und 80% durchgeführt worden. Wie schon erwähnt konnte dabei keine Abhängigkeiten von der Photoinitiatordichte gefunden werden. Diese Membranen zeigen allerdings die höchsten DG-Werte von allen getesteten MIPs und NIPs. Der durchschnittliche DG-Wert beträgt für die Membranen $2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Für die Abweichungen der einzelnen Messungen sind für die NIPs, genau wie für die MIPs mit IgG, geringe Werte von 12,5% gefunden worden. Die Abweichung zeigt sich dabei auch unabhängig von der UV-Zeit oder der Photoinitiatordichte. Für die MIPs, welche nach dem Epitop Verfahren hergestellt worden sind, zeigt sich eine etwas größere Abweichung. Diese beträgt 16% und ist dabei auch unabhängig von der Photoinitiatordichte der Membranen.

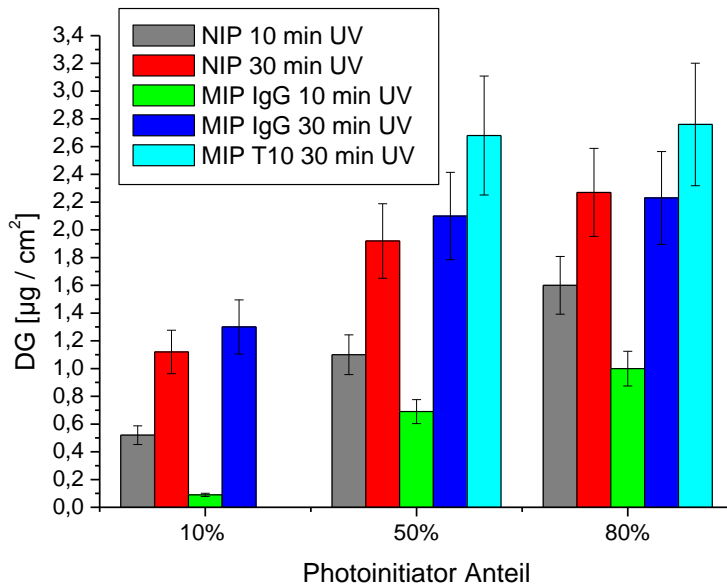


Abbildung 5.57 DG-Werte für die NIP und MIP Membranen.

5.7.2 Protein Adsorption

Die Protein Adsorption der NIP und MIP Membranen ist mittels statischer Adsorption durchgeführt worden. Die Durchführung der Messungen sind in Abschnitt 4.7.1 beschrieben. Bei diesen Messungen sind wieder jeweils drei Membranen mit der gleichen Beschichtung verwendet worden. Die Messungen ist dabei sowohl für das Protein IgG als auch für das Referenz Protein HSA erfolgt und die Ergebnisse nach der Desorption in Abbildung 5.58 aufgetragen. In Abbildung 5.58 a) sind dabei die Ergebnisse der IgG Messungen aufgetragen und in Abbildung 5.58 b) die Ergebnisse für das HSA.

Die Ergebnisse für die IgG Messungen zeigen keine generellen Trends. Nur für die Membranen mit dem NIPs und 10 min UV-Zeit nimmt die desorbierte Menge an IgG ab. Die Kapazität dieser Membranen verringert sich mit zunehmender Menge an Polymer von 2,8 mg/ml Membran auf 0,6 mg/ml Membran. Diese Tendenz konnte für die NIP Membranen, die 30 min bestrahlt worden sind, nicht gefunden werden. Diese Membranen zeigen bei einem geringen DG-Wert die geringste IgG Kapazität mit 2 mg/ml Membran und beim mittleren DG-Wert die höchste IgG Kapazität mit 4,6 mg/ml Membran. Die Kapazität der Membranen mit dem höchsten DG-Werten liegt genau dazwischen mit 3,4 mg/ml Membran.

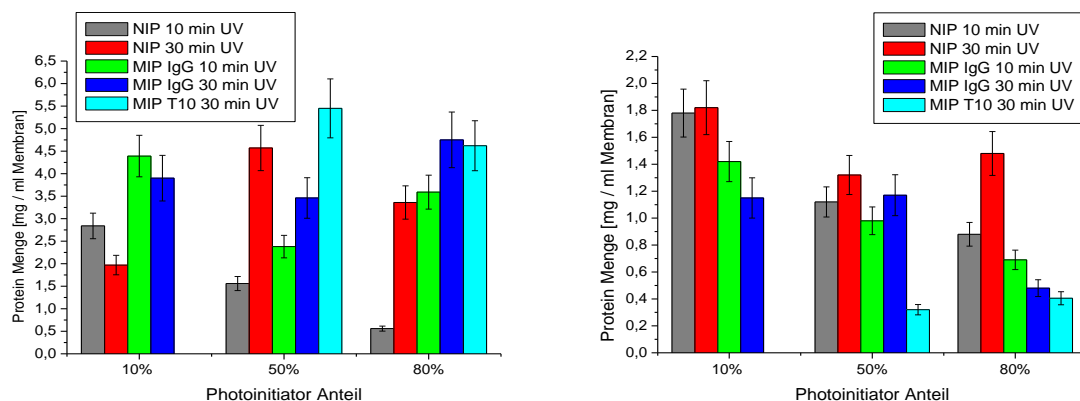
Die Adsorptionskapazitäten für die MIP mit IgG in der Reaktionslösung zeigen ähnliche Trends. Bei diesen Membranen sind die geringste IgG Kapazität bei den Membranen mit einem mittleren DG-Wert festgestellt worden. Hierbei zeigen die Membranen mit 10 min UV-Zeit eine Kapazität von 2,4 mg/ml Membran und die mit 30 min UV-Zeit eine Kapazität von 3,5 mg/ml Membran. Die Kapazitäten für die anderen beiden DG-Werte liegen auf ungefähr

dem gleichen Niveau. Die Kapazitäten der Membranen liegen dabei zwischen 3,6 mg/ml Membran und 4,6 mg/ml Membran.

Die IgG Kapazität der MIPs, die mit einem Epitop Peptid hergestellt worden sind, zeigen die größeren IgG Kapazitäten. Die Membranen, die bei einem Photoinitiatoranteil von 50% gepropft worden sind, zeigen mit 5,5 mg/ml Membran die größten Kapazitäten. Die anderen Membranen haben dagegen eine etwas geringere Kapazität von 4,5 mg/ml Membran.

Für die Messungen liegen die Abweichungen zwischen 10% und 12%. Außer für die MIP Membrane mit 30 min UV-Zeit. Bei diesen Membranen liegt die Abweichung mit 16% etwas höher. Dabei sind die Abweichungen für die MIPs mit IgG und mit T10 annähernd gleich.

Die Ergebnisse der HSA Adsorptionen zeigen im Gegensatz zu den IgG Adsorptionen alle eine deutliche Tendenz. Hierbei hatten die Membranen mit dem geringsten DG auch die geringste HSA Kapazität. Die NIP Membranen zeigen dabei Kapazitäten von 1,8 mg/ml Membran bis 0,9 mg/ml Membran. Die MIPs mit IgG zeigen dieselben Trends wie die NIPs. Allerdings sind bei diesen Membranen eine geringere Kapazität ermittelt worden. Diese betragen hierbei zwischen 1,4 mg/ml Membran und 0,5 mg/ml Membran. Die MIPs mit T10 als Epitop zeigen dagegen eine andere Tendenz. Von diesen Membranen ist die HSA Kapazität bei einem Photoinitiatoranteil von 50% mit 0,3 mg/ml Membran am geringsten. Die Membranen, die mit 80% Photoinitiatoranteil modifiziert worden sind, zeigen eine etwas größere Kapazität von 0,4 mg/ml Membran. Die Abweichungen bei diesen Messungen betragen für alle Membranen zwischen 10% und 13%.



a)

b)

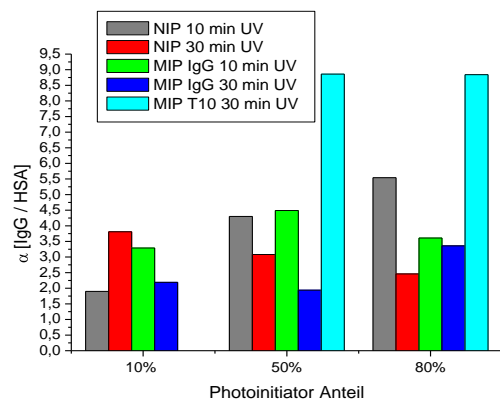
Abbildung 5.58 Ergebnisse der Protein Desorption auf für die NIP und MIP Membranen.

a) Ergebnisse der IgG Desorption. B) Ergebnisse der HSA Desorption.

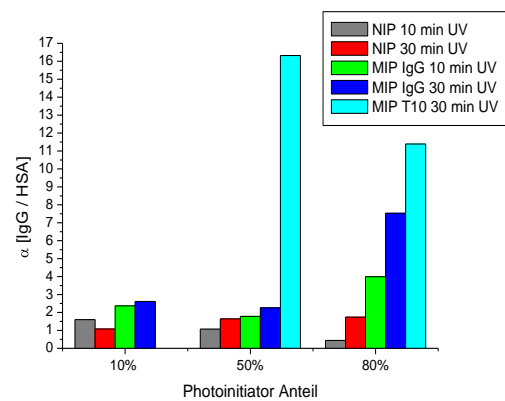
5.7.3 Protein Selektivitäten

Die Protein Selektivitäten sind aus den Ergebnissen der statischen Adsorptionsmessung nach Formel (12) berechnet worden. Die Berechnung erfolgt aus den Ergebnissen aller zuvor vermessenen Membranen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung 5.59 aufgetragen. Die Werte in Abbildung 5.59 a) stammen von den Adsorptionsmessungen. Für die Adsorption ist bei allen gemessenen Proben eine IgG Selektivität festgestellt worden. Dabei sind die Ergebnisse für die NIPs und die MIPs mit IgG annähernd gleich groß. Die Selektivitäten liegen bei diesen Messungen im Bereich von 2 bis 5,5. Auch konnte nur bei NIPs ein Trend festgestellt werden. Die Membranen mit 10 min UV-Zeit zeigen eine größere Selektivität bei einem höheren DG-Wert. Während die Tendenz bei den Membranen mit 30 min UV-Zeit genau entgegengesetzt verläuft. Für die MIPs mit dem Epitop Peptid T10 konnten die größten Selektivitäten detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Messungen liegen bei einem Wert von $\alpha = 8,5$. Da diese Ergebnisse aus den Adsorptionsergebnissen berechnet worden sind, betragen die Standardabweichung für diese Messungen ca. 20%.

Die Auftragung der Selektivitäten, die aus den Desorptionsergebnissen berechnet worden sind, erfolgt in Abbildung 5.59 b). Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich zu den Adsorptionsergebnissen einen Unterschied zwischen den NIPs und den MIPs. Die höchsten Selektivitäten sind dabei wieder von den MIPs mit dem Epitop Peptid T10 erreicht worden. Diese Membranen zeigen α Werte von 11 bzw. 16. Die höhere Selektivität zeigen dabei die Membranen, die mit einem Photoinitiatoranteil von 50% hergestellt worden sind. Zusätzlich zu diesen Membranen zeigen noch die IgG-MIPs bei einem Photoinitiatoranteil von 80% gute Selektivitäten. Hierbei sind α Werte von 7,5 für 30 min UV-Zeit und von 4 für 10 min UV-Zeit erreicht worden. Die restlichen Ergebnisse für die MIPs liegen im Bereich von $\alpha = 2$ bis 2,5. Nach der Desorption zeigen die meisten NIPs dagegen keine Selektivität mehr. Die α Werte für die NIPs liegen im Bereich von 0,44 bis 1,7. Mit Werten von 1 zeigen dabei die Membranen bei 50% Photoinitiatoranteil und 10 min UV-Zeit und 10% Photoinitiatoranteil und 30 min UV-Zeit keine Selektivität. Eine HSA Selektivität mit Werten von 0,4 zeigen die Membranen, die mit 80% Photoinitiatoranteil und 10 min UV-Zeit hergestellt worden sind. Alle anderen NIPs zeigen geringe IgG Selektivitäten mit Werten zwischen 1,6 und 1,7. Auch bei diesen Berechnungen sind wieder die Abweichung bestimmt worden und diese liegen bei ca. 20%.



a)



b)

Abbildung 5.59 Berechnete Selektivitäten für die NIP und MIP Membranen. a) Ergebnisse der Adsorption. B) Ergebnisse der Desorption.

6. Diskussion der Ergebnisse

6.1 Synthese

Monomere

Damit den Membranadsorbern die hohe Affinität und Selektivität zu IgG verliehen werden konnte, sind diese aus speziellen Monomeren hergestellt worden. Diese Monomere können selektive Bindungen zu bestimmten Aminosäuren eingehen. Da diese Monomere von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schrader entwickelt worden und nicht kommerziell erhältlich sind, mussten diese synthetisiert werden. Die durchgeführten Synthesen sind in Abschnitt 4.1 beschrieben und die erhaltenen Ergebnisse in Abschnitt 5.1.1 gezeigt.

Das Monomer 5-(Methacryllamino)-*m*-xylolbislithium-phosphosphatdimethylester (Abb. 5.1) zeigt nach der Synthese noch Verunreinigungen von Triethylamin und Nitro-*m*-Xylol. Die Verunreinigungen haben aber keinen Einfluss auf die Reaktivität des Monomers gezeigt. Das konnte durch eine Pfropf-Polymerisation mit dem selbst synthetisierten Monomer und einem „reinen“ Monomer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader festgestellt werden.

Bei der Abspaltung der Estergruppen in der vierten Stufe sind im $^1\text{H-NMR}$ (Abb. 5.3) keine klaren Unterschiede festgestellt worden. Es ist zwar die erwartete Verringerung der Peakintensität bei 3,74 ppm zu beobachten, allerdings ist zur Sicherheit noch ein IR-Spektrum angefertigt worden (Abb. 5.4). In diesem IR-Spektrum zeigen sich recht deutliche Unterschiede zwischen den Produkten der dritten und der vierten Synthesestufe.^[114,135] Nach Auswertung dieser Ergebnisse kann das Produkt der Stufe 4 als syntheseserein bezeichnet werden, da sich die geringen Mengen an Verunreinigungen nicht negativ auf die Reaktionsfähigkeit auswirken.

Die Synthese des Monomers 6'-Deoxy-6'-(N-(2-methyl)methacrylamid- β -cyclodextrin (Abb. 5.5) ist nur nach der dritten Stufe mittels $^1\text{H-NMR}$ kontrolliert worden. Hierbei zeigte sich, dass das Produkt noch Spuren von Ethanol und Ethylendiamin enthalten hat. Die Spuren von Ethanol können durch ein nicht vollständig getrocknetes Produkt erklärt werden. Die Anwesenheit von Ethylendiamin nach der Reaktion ist auf eine recht starke Bindung von Ethylendiamin an den β -Cyclodextrin Ring zurückzuführen. Für die Bindung an den β -Cyclodextrin Ring spricht, dass Ethylendiamin aufgrund der durchgeführten Reinigung entfernt worden sein müsste.^[140] Die Reaktivität des selbst synthetisierten Monomers ist wieder mit dem gleichen Monomer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader überprüft worden. Dazu wurden Membranen mit dem selbst synthetisierten Monomer und dem der aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader bei gleichen Reaktionsbedingungen beschichtet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind nicht extra aufgetragen worden aber gehen in die Ergebnisse der Pfropf-Polymerisation auf PET-Membranen ein (Abb. 5.16). Auch hierbei zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Monomeren und das Produkt konnte als syntheseserein bezeichnet werden.

Als drittes und letztes Monomer ist N-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N-bis(carboxymethyl)-L-Lithiumlysinat (Abb. 5.7) hergestellt worden. Dieses Monomer ist nach Stufe 2 (Abb. 5.8) und Stufe 3 (Abb. 5.9) mit ^1H -NMR analysiert worden. Nach der zweiten Stufe sind noch Reste von Ethylbromacetat im Produkt. Dieses Ethylbromacetat stammt aus der ersten Stufe und weist auf eine zu geringe Fraktionierung der Säulenchromatographie hin. Nach der dritten Stufe ist aber kein Ethylbromacetat mehr gefunden worden. Es hat in der dritten Stufe mit LiOH reagiert und LiBr und Ethylacetat gebildet, das beim Reinigen entfernt worden ist. Nach der dritten Stufe ist eine Tieffeldverschiebung aller NMR-Peaks beobachtet worden. Diese Tieffeldverschiebung lässt auf freie Ionen in der NMR-Lösung schließen. Diese Ionen sind Li-Ionen und zeigten eine erfolgreiche Reaktion an. Auch bei diesem Monomer zeigt der Vergleich mit den Monomeren aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader wieder gleich Ergebnisse nach der Pfropf-Polymerisation. Daher konnte auch das dritte Monomer als syntheseserein bezeichnet werden.

Photoinitiatoren

Neben den Monomeren sind auch die verwendeten Photoinitiatoren selbst hergestellt worden (Abschnitt 4.1.4, 4.1.5). Diese Synthesen sind notwendig gewesen, da kein kommerziell erhältlicher „Typ I“ Photoinitiator auf Benzoinethylether Basis die erforderlichen Endgruppen aufweist. Die Zielprodukte sind 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure (Abb. 5.10) bzw. 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid (Abb. 5.12a) und die Ergebnisse sind in Abschnitt 5.1.2 dargestellt.

Die Synthese von 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure ist eine zweistufige. Nach Stufe zwei ist das Produkt mittels Elementaranalyse ^1H -NMR analysiert worden. Die ^1H -NMR-Daten zeigen keine Abweichungen zwischen den Literaturwerten und den gefundenen Peaks. Lediglich ein Peak bei 2,17 ppm ist zusätzlich gefunden worden. Dieser Peak stammt von Aceton, das zum Reinigen der NMR-Röhrchen verwendet worden ist. Die Ergebnisse der Elementaranalyse zeigen geringe Abweichungen von den Literaturwerten. Diese Abweichungen sind auf Reste vom Lösungsmittel DMSO zurückzuführen. Das Produkt 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure ist daher als rein betrachtet worden.

Die Herstellung des bromierten Photoinitiators 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid ist einstufig und mittels Hell-Volhard-Zelinsky Reaktion^[118] durchgeführt worden. Die Analyse ist mit ^1H -NMR, Elementaranalyse und IR-Spektroskopie erfolgt. Diese Ergebnisse zeigen an, dass eine Mischung (1/1) aus 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid und 2-Brom-4-ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäurebromid (Abb. 5.12b) erhalten worden ist. Das Nebenprodukt ist ein Zwischenprodukt bei der Hell-Volhard-Zelinsky Reaktion und sollte durch die Menge an Brom, eine kurze Reaktionszeit und eine moderate Temperatur unterdrückt werden. Beim Vergleich mit der Literatur zeigt sich, dass die Temperatur und die

Reaktionszeit für die gewünschte Reaktion richtig gewählt worden sind.^[118] Daher ist das Nebenprodukt wahrscheinlich auf eine nicht korrekte Stöchiometrie zwischen Brom und 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenyl-pentansäure zurück zu führen. Diese weitere Bromierung stellt aber für die Immobilisierung kein Problem dar. Die Immobilisierungsreaktion erfolgt über die bromierten Carbonsäure-Gruppe. Weiterhin zeigt die Literatur, dass das Brom an der α -Position durch das Triethylamin während der Immobilisierungsreaktion abgespalten werden sollte.^[141] Auch zeigen die Pfropf-Polymerisationen mit den beiden Photoinitiatoren gleiche DG-Werte (Abb. 5.28). Es ist also davon auszugehen, dass die Immobilisierungsreaktionen zu gleichen Photoinitiatordichten und somit zu gleichen Pfropfpolymerisationen führen. Daher konnte der Photoinitiator 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure-bromid für die Pfropf-Polymerisationen verwendet werden.

6.2 Pfropfung der Membranen

6.2.1 Einfluss der Initiierung

Einfluss auf die Immobilisierung

Die Etablierung des neuen Photoinitiatorsystems ist auf PET-Membranen durchgeführt worden und es zeigt sich, dass bei den Reaktionsbedingungen Grenzwerte erreicht werden, bei denen keine Erhöhung der Photoinitiatordichte mehr erreicht werden konnte. Bei der Konzentration zeigt sich ein Grenzwert von 16,7 mg / ml. Ebenso zeigt sich keine deutliche Erhöhung mehr wenn der Reaktionszeit von 1 h auf 2 h erhöht wird. Bei der Immobilisierung des Photoinitiators ist zusätzlich kein Einfluss des Materials zu erkennen. Zwar konnte der Photoinitiator nur qualitativ auf den PET-Membranen bestimmt werden, aber die Ergebnisse der Pfropf-Polymerisationen führen zu annähernd gleichen Ergebnissen.

Tabelle 6.1 Vergleich der Immobilisierungsmethoden mit verschiedenen Monomeren. Ein Photoinitiatoranteil von 100% ist verwendet worden.

	Monomer	Methode 1	Methode 2	Methode 3
DG [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	2-Hydr	$2,1 \pm 0,31$	$1,87 \pm 0,28$	$2,01 \pm 0,30$
DG [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	GAMA	$2,23 \pm 0,33$	$2,31 \pm 0,35$	$2,08 \pm 0,31$
DG [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	2-Hydr/Bis	$0,25 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,04$

Die Vergleichsmessungen in Tabelle 6.1 ergeben leichte Abweichungen zwischen PET- und Cellulose Membranen. Die Abweichungen sind dabei im Bereich des Messfehlers und somit kann für die PET-Membranen die gleiche Oberflächenbedeckung angenommen werden wie für die Cellulose Membranen. Weiterhin zeigen auch die beiden Methoden für die Immobilisierung auf den Cellulose Membranen gleiche Ergebnisse (Tab. 6.1, Abb. 5.28). Auch zwischen den beiden Methoden ist der Unterschied im Bereich des Messfehlers. Daher kann gesagt werden, dass sich die Immobilisierungsmethoden gleich verhalten und die

Immobilisierung auf den beiden Materialien gleich verläuft. Daher kann auch hierbei davon ausgegangen werden, dass die ähnlich verlaufen und zu einer vollständig belegten Oberfläche führen.

Vergleich mit Synergist

Die Methode des immobilisierten „Typ I“ Photoinitiators ist, im Anschluss, mit der bereits etablierten „Synergist Immobilisierung“ verglichen worden.^[49] Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 5.7 aufgetragen und wie erwartet ist bei den Kontrollproben (ohne PI) keine Pfropfung erhalten worden. Auf den PET-Membranen zeigen beide Verfahren eine kontrollierte Pfropf-Polymerisation, wobei etwas geringere DG-Werte für den immobilisierten „Typ I“ Photoinitiator erhalten worden sind. Kontrolliert heißt in diesem Fall, dass für alle verwendeten PET-Membranen bei gleichen Bedingungen annähernd gleiche DG-Werte erhalten werden. Beim Betrachten der verwendeten Photoinitiatormengen zeigt sich aber ein deutlicher Unterschied. Für die „Synergist Immobilisierung“ ist eine um den Faktor 1000 größere Photoinitiatormenge benötigt worden um den gleichen DG-Wert zu erreichen. Für die Cellulose Membranen zeigt nur der immobilisierte „Typ I“ Photoinitiator eine kontrollierte Reaktion. Für die „Synergist Immobilisierung“ sind auf den Cellulose Membranen zwar hohe aber nicht reproduzierbare DG-Werte gefunden worden. Entscheidend ist, wie der Photoinitiator bei dieser Methode angewendet wird. Bei der „Synergist Immobilisierung“ wird der Photoinitiator Benzophenon einfach zur Reaktionslösung gegeben. Der Photoinitiator produziert dann Radikale an allen „aktivierten“ CH₂-Gruppen.^[91,92] Bei „aktivierten“ CH₂-Gruppen handelt es sich um CH₂-Gruppen, an die ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom bindet. Durch dieses Atom wird dann Elektronendichte von der CH₂-Gruppe abgezogen und es kann leichter ein Wasserstoff abgespalten werden.^[91,92] Bei der Anwesenheit von Amin-Gruppen kommt es zusätzlich noch zu einer Orientierung des Benzophenons, was die Abstraktion eines Wasserstoffs begünstigt (Abb. 2.9).^[123] Da in Cellulose schon viele aktivierte CH₂-Gruppen vorhanden sind, kann die Reaktion an einer beliebigen Stelle initiiert werden und nicht wie beim PET an definierten Positionen. Durch diese beliebige Initiierung ändert sich die Ordnung der Reaktion von pseudo erster Ordnung, mit einem deutlichen Überschuss an Photoinitiator, zu pseudo zweiter Ordnung, mit einem annähernd stöchiometrischen Verhältnis an Photoinitiator zu „aktivierten“ CH₂-Gruppen. Dadurch ist eine vollständige Initiierung wie beim PET nicht mehr gegeben. Die Anzahl an Initiierungen ist dann Abhängig von der Diffusion des Photoinitiators und es kommt zu starken Schwankungen im DG-Wert. Diese Schwankungen im DG-Wert sind bei den mittels „Synergist Immobilisierung“ gepfropften Cellulose-Membranen zu sehen (Tab. 5.7).

Für den immobilisierten „Typ I“ Photoinitiator ist dieser Kontrollverlust nicht möglich, da der Initiator auf der Oberfläche fixiert ist und Radikale nur an diesen Stellen entstehen können.

Der deutlichste Unterschied ist jedoch beim Betrachten der Nebenprodukte festgestellt worden. Hierbei zeigt der immobilisierte „Typ I“ Photoinitiator vierzehnmal weniger Nebenprodukte, mit einer deutlich geringeren Molmasse, als die „Synergist Immobilisierung“. Dies ist auch wieder auf die Initiierung zurückzuführen. Diese ist beim Immobilisierten „Typ I“ Photoinitiator direkt auf die Oberfläche beschränkt und das Radikal wird nur am Initiator produziert. Das Nebenprodukt ist bei dieser Methode auf den Zerfall des Initiators zurückzuführen. Bei der Initiierung zerfällt der „Typ I“ Photoinitiator auf der Membranoberfläche in zwei Radikale.^[151] Von diesen Radikalen ist das reaktivere auf der Oberfläche immobilisiert. Unter den ausgewählten Reaktionsbedingungen sollte sich das stabilisierte zweite Radikal nicht lösen und dadurch sollten Nebenreaktionen unterdrückt werden. Die geringe Nebenproduktbildung zeigt, dass dieses Konzept aufging. Im Gegensatz dazu konnte der „Typ II“ Photoinitiator Benzophenon durch Abstraktion eines Wasserstoffs ein Radikal an jeder möglichen „aktivierten“ CH₂-Gruppe initiieren.^[91,92] Da die Methacrylamidgruppe und die Funktionalgruppe der Monomere meist durch Diamine verbunden sind, enthalten die meisten Monomere auch „aktivierte“ CH₂-Gruppen. Daher ist auch eine Direktinitiierung der Monomere möglich und es kommt zu mehr Nebenprodukten. Die Methode des immobilisierten „Typ I“ Photoinitiators zeigt im Vergleich zur „Synergist Immobilisierung“ ähnliche DG-Werte bei einem geringeren Photoinitiatoreinsatz. Auch weist diese Methode sehr viel weniger Nebenprodukt auf.

Pfropfdichten

Zur Bestimmung der Pfropfdichten sind die Photoinitiatordichten und die Molmassen der gepfropften Polymere bestimmt worden. Die Bestimmungen sind nur auf Cellulose Membranen durchgeführt worden und die Ergebnisse sind in Abschnitt 5.3.2 und 5.3.3 dargestellt.

Hierbei zeigt sich sowohl bei der qualitativen als auch bei der quantitativen Bestimmung der Photoinitiatordichte ein unerwarteter Verlauf. Die Photoinitiatordichten steigen nur bis zu einem Photoinitiatoranteil von 80% in der Immobilisierungslösung. Bei einem Anteil von 100% Photoinitiator sinkt die Photoinitiatordichte wieder ab. Für die Photoinitiatoranteile von 10% und 100% sind dieselben Dichten gefunden worden. Dabei ist erwartet worden, dass die Photoinitiatordichte abhängig vom Photoinitiatoranteil ansteigen sollte. Auch hierbei zeigen die Immobilisierungsmethoden gleiche Ergebnisse. Dabei hat die Zugabe von Benzoesäure bzw. Benzoesäurebromid eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften zur Folge. Die Hydrophile der Oberflächen nimmt dadurch ab. Zusätzlich sind die kleineren Moleküle Benzoesäure bzw. Benzoesäurebromid sterisch nicht so stark gehindert wie die Photoinitiatoren und können somit schneller mit der Membranoberfläche reagieren. Durch die Reaktion dieser Moleküle ist der Charakter der Membranoberflächen hydrophober

geworden. Mit dieser hydrophoberen Oberfläche können die aromatischen Gruppen in den Photoinitiatoren nun Wechselwirkungen eingehen.^[150] Durch diese Wechselwirkungen werden die Photoinitiatormoleküle länger an der Membranoberfläche gehalten, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit der Oberfläche erhöht wird. Bei einem Photoinitiatoranteil von 100% erfolgt keine schnelle Änderung der Hydrophilie der Oberflächen, es kommt zu keiner Akkumulierung und somit auch zu keiner Beschleunigung der Reaktion. Es ist also möglich, dass durch eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeit höhere Photoinitiatordichten erreicht werden. Allerdings muss die Verlängerung schon recht deutlich ausfallen, da bei einer Verdopplung der Reaktionszeit nur eine geringe Erhöhung der Photoinitiatordichte festgestellt worden ist. Das hängt damit zusammen, dass die möglichen Reaktionsplätze mit der Zeit verringert werden und somit nur noch recht wenig Photoinitiator mit der Oberfläche Reagieren kann.

Da durch die Moleküle Benzoessäure bzw. Benzoessäurebromid aber auch mögliche Reaktionsplätze verloren gehen, zeigt sich der Trend, dass bei geringem Photoinitiatoranteil auch weniger Photoinitiator auf der Oberfläche zu finden ist. Dies wird auch durch die gefundenen Benzoessäuredichten bestätigt. Bei einem geringen Photoinitiatoranteil von 10% liegt diese Dichte bei etwa 1000 pmol/cm^2 und sinkt mit steigendem Photoinitiatoranteil ab. Da der Benzoessäurepeak und der Peak für das Lösungsmittel nicht sehr gut getrennt werden konnten, sind diese Messungen aber mit einem großen Fehler behaftet (Abb.5.29). Daher zeigt sich auch für die Messungen mit 100% Photoinitiatoranteil noch eine scheinbare Benzoessäuredichte.

Nach diesen Messungen ist für jede Photoinitiatordichte die Molmasse des gepfropften 2-Hydr bestimmt worden, um daraus die Pfropfdichten zu berechnen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind dabei in Tabelle 5.4 aufgetragen und zeigen eine klare Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte. Die Molmassen sind dabei umso kleiner, je größer die Photoinitiatordichte ist. Dieser Zusammenhang wird dabei erwartet und ist schon mehrfach in der Literatur beschrieben.^[83,152] Hierbei kommt es zu dem Effekt, dass die höhere Photoinitiatordichte zu mehr Radikalen auf der Membranoberfläche führt. Diese Radikale können dabei alle einen Kettenstart initiieren. Somit werden bei einer großen Photoinitiatordichte mehr Polymerketten gestartet als bei einer kleinen Dichte. Allerdings ist die Menge an Monomer gleich. Dadurch müssen sich mehr Ketten die Monomere teilen und es kommt zwar insgesamt zu mehr Reaktionen mit den Monomeren aber die Wahrscheinlichkeit wird geringer, dass ein Monomer mit einer der Polymerketten reagiert. Durch diesen Effekt sind die Kettenlängen bei großen Photoinitiatordichten meistens kleiner als bei geringen Dichten.^[83,152]

Auch bei den berechneten Pfropfdichten sind die gleichen Tendenzen wie bei den Photoinitiatordichten zu erkennen. Wieder haben die Pfropfdichten für die Membranen mit

10% und 100% Photoinitiatoranteil die gleichen Werte. Dabei zeigt sich auch, dass die Initiierungseffizienz bei fast 100% liegt. Diese Effizienz nimmt mit steigender Photoinitiatordichte ab. Diese Abnahme in der Initiierungseffizienz liegt in der Zugänglichkeit der Photoinitiator-gruppen auf der Oberfläche begründet. Bei geringen Photoinitiatordichten liegen die Gruppen weit auseinander und es können an allen Gruppen Monomere initiiert werden. Dies ist möglich, da es hierbei zu keiner sterischen Behinderung durch die Monomere kommt. Da die Initiierung der Monomere in einer Lösung nie gleichzeitig passiert, werden bei den größeren Photoinitiatordichten einige Photoinitiatorgruppen durch bereits wachsende Polymerketten abgeschirmt.^[153] Durch diese Abschirmung können keine weiteren Monomere den benachbarten Initiator erreichen und keine weiteren Polymerketten starten. Dieser Effekt nimmt zu, je dichter die Initiator-Gruppen aneinander liegen.

Die Struktur von gepfropften Polymeren kann generell in zwei Gruppen unterteilt werden. Das sind die Pilz-Struktur und die Bürsten-Struktur. Die Pilz-Struktur tritt auf wenn die Polymere in einen großen Abstand zueinander auf der Oberfläche haben. Bei einem großen Abstand liegen die Polymere in einer thermodynamisch günstigen Form vor. Wenn der Abstand zwischen den Polymeren nun verringert wird richten sich diese durch eine kinetische Hinderung auf. Dieser Übergangsbereich wird in der Literatur^[154] beschrieben und ist abhängig von der Molmasse und dem Abstand der Polymeren. Diese Berechnung zeigt, dass bei den hohen Pfropfdichten die Polymere in einer Bürsten-Struktur vorliegen und bei den kleiner Pfropfdichten in einer Pilz-Struktur. Konkret sind die Berechnungen in Tabelle 6.2 Aufgetragen. Für den hydrodynamischen Radius sind Literaturwerte für Polyacrylamid verwendet worden.^[168] Aus diesen Werten und den Molmassen ergibt sich dann nach Literatur^[154] der Übergang zwischen Pilz und Bürstenstruktur. Aus dem Übergangsbereich und der Pfropfdichte kann dann die Struktur bestimmt werden.

Tabelle 6.2 Ergebnisse der Berechnungen zur Oberflächenbedeckung und zum Übergang zwischen Pilz- und Bürstenstruktur (Übergang [Moleküle/nm²]. Die Probe Literatur gibt die Werte aus der Literatur^[154] an.

Probe	Molmasse [kg/mol]	hydrodyn.- Radius [nm]	Oberflächen- bedeckung [nm ²]	Übergang [Moleküle/nm ²]	Pfropfdichte [Moleküle/nm ²]
Literatur	17	2,6	21	6,50E-02	
2-Hydr 10%	317	72,0	16257	8,45E-05	3,57E-01
2-Hydr 50%	276	62,5	12256	1,12E-04	4,08E-01
2-Hydr 80%	97	21,1	1397	9,84E-04	6,93E-01
2-Hydr 100%	353	80,3	20236	6,79E-05	2,27E-01

6.2.2 Polymerisation

Abschätzung der Reaktivität durch Vergleich der DG-Werte

Gepfropfte Homopolymere

Die ersten Pfropfungen der Membranen sind auf PET-Kernspurmembranen durchgeführt worden. Mit diesen Membranen wird auch der Einfluss der Beschichtungen auf die Membraneigenschaften charakterisiert. Hierbei sind neben dem Pfropfungsgrad auch der Kontaktwinkel und die Permeabilität untersucht worden (Abschnitt 6.2.3). Auch ist der Einfluss eines „Abstandhalter“-Monomers auf die Pfropf-Polymerisation bestimmt worden.

Bei den ersten Pfropf-Polymerisationen mit den funktionalen Monomeren zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität der einzelnen Monomere (Abb.5.16). Trotz derselben reaktiven Gruppe gibt es Unterschiede im DG-Wert um den Faktor 20. Das Reaktionsverhalten der unterschiedlichen Monomere sowie die geringen Umsätze von nur 1% deuten auf eine kinetische Kontrolle der Pfropf-Polymerisationen hin.^[142] In Tabelle 6.3 sind für die Pfropfpolymerisation wichtige physikalische Eigenschaften der Monomere aufgetragen.

Tabelle 6.3 Physikalische Eigenschaften der Monomere

Monomer	Molmasse [g/mol]	logKOW	Ladung
2-Hydr	143	0,61	keine
GAMA	306	-3,24	keine
Bis	347	n.V.	2 mal neg.
β-Cyc	1245	-3,24	keine
Dode	239	6,1	keine
Ammo	129	n.V.	1 mal pos.
C-Hex	181	3,49	keine
Bzamidin	203	0,9	partiell pos.
B(OH)2	262	n.V.	keine

Die Unterschiede in der Reaktivität sind also in der Kinetik der Monomere zu suchen, da alle Funktionalmonomere eine Methacrylamid Gruppe als Reaktivgruppe besitzen. Diese Gruppe sollte unter gleichen Reaktionsbedingungen auch gleich reagieren. Es zeigt sich aber, dass die Funktionalgruppen der Monomere in die Reaktion eingreifen ohne direkt daran beteiligt zu sein. Der kinetische Einfluss zeigt sich besonders bei den geladenen Monomeren und bei denen mit einer großen Endgruppe. Mit diesen Monomeren sind nur kleine DG-Werte erreicht worden, während Monomere mit kleinen Molmassen und hydrophoben Endgruppen hohe DG-Werte zeigen. Bei den Monomeren mit großen Endgruppen, wie β-Cyc (1245 g/mol), ist die verringerte Reaktivität auf eine sterischen Behinderung zurückzuführen. Durch die große β-Cyclodextrin-Gruppe (1132 g/mol) werden die Reaktivgruppen zu einem großen Teil abgeschirmt, was wiederum zu einer schlechten Zugänglichkeit der Reaktivgruppen führt. Durch diese schlechte Zugänglichkeit wird die Reaktion gebremst und es werden nur kleine DG-Werte erhalten.

Für die geladenen Monomere ist die elektrostatische Abstoßung der Grund für die schlechten Reaktivitäten. Die Ladungen sind dabei bei den beiden geladenen Monomeren Bis (2-fach negativ, 347 g/mol) und Ammo (1-fach positiv, 129 g/mol) in den Funktionalgruppen enthalten. Die größte Ladungsdichte befindet sich dabei beim Bis Monomer an den Phosphatgruppen und bei Ammo an der Amingruppe. Dadurch kommt es zu abstoßenden Wechselwirkungen wenn sich die Funktionalgruppen von zwei Bis bzw. zwei Ammo Monomeren begegnen. Diese Wechselwirkung der Funktionalgruppen bedingt eine sehr kurze Kontaktzeit zwischen einem geladenen Monomeren und einer Polymerkette mit der gleichen Ladung. Durch diese verringerte Kontaktzeit wird auch die Wahrscheinlichkeit geringer, dass ein Monomer ins Polymer eingebaut wird. Zusätzlich dazu wird mit fortgeschrittener Reaktion die Ladung der Oberfläche verändert und die Oberfläche erhält die gleiche Ladung wie die Monomere. Dadurch wird die Adsorption der Monomere an die Membranoberfläche stark verringert und die Reaktion wird weiter gebremst.

Im Gegensatz dazu zeigen die Monomere 2-Hydr (143 g/mol) und Dode (239 g/mol) deutlich größere und fast gleiche DG-Werte. Daraus kann geschlossen werden, dass die sterische Behinderung durch die Endgruppen dieser Monomere recht gering ist. Für das Monomer 2-Hydr ist die Annahme gerechtfertigt, da die Funktionalgruppe dieses Monomers mit 59 g/mol nur etwa 40% der Masse des Monomers ausmacht. Für das Dode Monomer ist nicht unbedingt zu erwarten gewesen, da das Monomer Dode eine recht lange Alkylkette besitzt. Diese Alkylkette hat eine Molmasse von 170 g/mol und macht damit 70% der gesamten Masse des Monomers aus. Allerdings wird wahrscheinlich die sterische Hinderung der Alkylkette durch anziehende hydrophobe Wechselwirkungen wieder ausgeglichen. Diese Annahme bestätigt auch die Betrachtung des logKow-Werts^[164] für die Dodecyl-Kette des Monomers. Der logKow ist der *n*-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient und gibt die Hydrophile bzw. die Hydrophobie eines Stoffes an. Bei geringen Werten ist ein Stoff hydrophil und bei hohen Werten hydrophob. Der logKow-Wert von der Dodecyl-Kette liegt bei 6,1 und zeigt damit an, dass diese Kette stark hydrophob ist.^[164] Dadurch ist es wahrscheinlich, dass es zwischen zwei Dodecyl-Ketten während der Polymerisation zu attraktiven Wechselwirkungen kommt. Die Funktionalgruppe des 2-Hydr Monomers hat dagegen nur einen sehr geringen logKow-Wert von 0,61, daher sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen 2-Hydr Monomeren nicht wahrscheinlich.^[164] Zusätzlich tritt bei diesen Membranen noch ein gegenteiliger Effekt wie bei den geladenen Monomeren auf. Durch eine fortschreitende Reaktion nimmt die Membranoberfläche mit der Zeit die Eigenschaften der Monomere an. Dadurch wird besonders beim Dode-Monomer die Adsorption an die Oberfläche durch Wechselwirkungen verbessert. Durch diese verbesserte Adsorption sind somit mehr Monomere an der Oberfläche verfügbar und die Reaktion wird verbessert.

Einfluss der Copolymerisationen

Auch bei den Copolymerisationen konnte aus dem Reaktionsverhalten auf eine kinetische Kontrolle geschlossen werden. Hierbei zeigt sich, dass die DG-Werte bei den Copolymerisationen im Vergleich zur Homopolymerisation ansteigen. Besonders stark ist dieser Effekt, wenn die geladenen Monomere Bis und Ammo miteinander reagieren. Bei dieser Copolymerisation ist der DG-Wert um den Faktor zwanzig erhöht worden. Durch diese deutliche Erhöhung ist davon auszugehen, dass diese Monomere aufgrund der unterschiedlichen Ladung anziehende elektrostatische Wechselwirkungen zueinander haben und in einer alternierenden Folge (ABAB) polymerisierten. Dabei kommt es wahrscheinlich zu einer Anordnung, bei der die Funktionalgruppen im Polymer miteinander interagieren können. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass die Ladungsdichte der Monomere in bestimmten Bereichen der Funktionalgruppe am größten ist. Dadurch kommt es an diesen Stellen zu starken elektrostatischen Wechselwirkungen.

Eine ebenfalls starke Erhöhung zeigen die Co-Polymere aus den geladenen Monomeren bzw. dem großen β -Cyc Monomer mit Dode. Durch das recht hydrophobe Dode Monomer werden die geladenen- und das β -Cyc Monomer verdünnt. Durch diese Verdünnung müssen keine Reaktionen mehr zwischen Reaktanden mit gleicher Ladung erfolgen, sondern ein geladenes Monomer konnte mit einem Dode in der Polymerkette reagieren. Durch das Dode Monomer wird dann die Ladung der bereits polymerisierten geladenen Monomere abgeschirmt und die elektrostatische Abstoßung wird gedämpft. Bei β -Cyc Monomeren wird hingegen der Einfluss der sterischen Hinderung verringert. Auch hierbei ist der Effekt wieder auf eine Verdünnung zurück zu führen.

Auf Grund dieser Daten sind alle weiteren Pfröpfungen mit dem „Abstandhalter“-Monomer 2-Hydr im Verhältnis 3/1 bzw. 3/1/1 durchgeführt worden. Dies hat den Vorteil, dass bei allen Messungen der DG-Wert erhöht worden ist und dass der Verbrauch an funktionalen Monomeren deutlich verringert werden konnte. Besonders für die geladenen Monomere ist eine starke Erhöhung des DG-Wertes erhalten worden. Diese Erhöhung beruht wieder auf der Ladungsabschirmung durch das „Abstandshalter“-Monomer.

Zusammensetzung der Copolymere

Um einen ersten Überblick über die Polymer-Zusammensetzung zu bekommen, sind die relativen Reaktivitäten der Monomere bestimmt worden. Diese Bestimmung vergleicht die DG-Werte der Co-Polymere mit 2-Hydr und bezieht sich auf das reine Polymer aus 2-Hydr als Referenz. Es konnte dabei festgestellt werden, dass die Reaktionen durch die Mischung von 2-Hydr mit den Monomeren Bis, β -Cyc, Ammo, Dode, Bzamidin, $B(OH)_2$ stark gebremst werden. Daher ist davon auszugehen, dass auch die Reaktivitäten dieser Monomere deutlich geringer sind als die des 2-Hydr. Im Gegensatz dazu ist für das Monomer C-Hex eine größere relative Reaktivität gefunden worden. Daher wird von diesem Monomeren erwartet, dass die Reaktivitäten höher sind als beim 2-Hydr.

Dabei zeigt sich wieder der kinetische Einfluss auf die Polymerisationen. Die vergleichsweise großen und sterisch anspruchsvollen Monomere wie Bis (347 g/mol), β -Cyc (1245 g/mol), Bzamidin (203 g/mol) und Dode (239 g/mol) bremsen die Polymerisation. Das rührt daher, dass die Zugänglichkeit der Reaktivgruppe durch die Funktionalgruppe eingeschränkt wird. Bei Monomer Bis und bei Ammo kommt noch der Einfluss der Ladung dazu. Diese Ladungen sorgen für abstoßende Wechselwirkungen und dadurch zu verringerten Einbau ins Polymer.

Bei Monomer Dode ist zu erwarten gewesen, dass durch hydrophobe Wechselwirkungen der sterische Einfluss wieder ausgeglichen wird. Allerdings ist das Monomer bei diesem Versuch mit 2-Hydr verdünnt und dadurch ist der Anteil an hydrophoben Gruppen geringer. Dadurch wird der sterische Anspruch des Dode Monomers nicht durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgeglichen.

Anders verhält es sich da beim C-Hex Monomer. Dieses Monomer hat mit seiner Molmasse von 181 g/mol einen nicht so großen sterischen Anspruch. Zusätzlich dazu ist die Cyclohexylgruppe im C-Hex Monomer nicht so beweglich wie die Dodecylkette im Dode Monomer, dadurch ist es unwahrscheinlicher, dass die Reaktivgruppe im C-Hex Monomer vollständig abgeschirmt wird. Weiterhin hat das C-Hex Monomer noch einen relativ hydrophoben Charakter. Dies äußert sich in einem logKow-Wert der Cyclohexylgruppe von 3,49. Somit wird bei Monomer C-Hex keine sterische Hinderung zu beobachten, aber ein Anteil an anziehenden hydrophoben Wechselwirkung. Diese Wechselwirkungen bewirken einen verbesserten Einbau dieses Monomers in das Polymer und erhöhen somit die relative Reaktivität.

Die genaue Polymerzusammensetzung ist bei einem identischen DG-Wert von 0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}$ untersucht worden (Abschnitt 5.3.4). Die Umsätze sind bei diesem geringen DG-Wert mit ca. 1% nur recht niedrig. Dadurch kann von kinetisch kontrollierten Polymerisationen ausgegangen werden. Diese kinetische Kontrolle ermöglicht es, von der Polymerzusammensetzung auf die Reaktivitäten der Monomere zu schließen. Die

Copolymerzusammensetzung (Tab. 5.5) ist dabei stark durch die eingesetzten Monomere beeinflusst. Diese Abhängigkeit ist auf die relativen Reaktivitäten zurückzuführen.

Die Referenzmischung aus Acrylsäure und Acrylamid zeigt, dass die Methode für die Aufklärung der Zusammensetzungen verwendet werden kann. Schon in früheren Studien sind ähnliche relative Reaktivitäten bei Pfropf-Copolymerisationen aus wässrigen Lösungen für diese Mischungen ermittelt worden.^[84]

Die anderen Resultate zeigen, dass die geladenen Monomere wie erwartet geringe Reaktivität aufweisen. Dies ist wieder auf abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen diesen Monomeren zurückzuführen. Ebenso zeigt auch das β -Cyc Monomer nur eine geringe Reaktivität. Die große sterische Hinderung ist dafür verantwortlich, dass es immer nur mit einem großen Abstand zu einem weiteren β -Cyc ins Polymer eingebaut wird. Im Gegensatz dazu haben das Dode Monomer und der „Abstandhalter“ 2-Hydr etwa die gleiche Reaktivität. Auch hierbei hängt die Reaktivität der beiden Monomere mit ihrer Molmasse und der damit verbunden sterischen Hinderung zusammen. Dabei wird die höhere Molmasse des Dode Monomers wieder durch seinen hydrophoben Charakter und der damit verbundenen hydrophoben Wechselwirkung ausgeglichen. Die größere Molmasse des GAMA mit 306 g/mol führt zu einer verlangsamten Diffusion im Vergleich zum 2-Hydr und zu einer etwas größeren sterischen Hinderung.^[155,156] Auch zeigt der logKow-Wert der Glucose mit -3,24 eine stark hydrophile Tendenz.^[165] Dadurch wird die Polymerisation dieses Monomers nicht durch hydrophobe Wechselwirkungen unterstützt und es zeigt aufgrund der sterischen Hinderung eine etwas geringere Reaktivität als das 2-Hydr.

Zur weiteren Analyse der Copolymere ist die Bestimmung der Reaktionsverhältnisse r_1 und r_2 , der binären Mischungen, mit Hilfe der Mayo-Lewis Gleichung erfolgt. Daraus sind die Taktizitäten bestimmt worden.^[136]

Die Ergebnisse in Tabelle 5.6 und Abbildung 6.1 ergaben dann für die Referenzmischung wie erwartet eine statistische Polymerisation das heißt, beide Reaktionskonstanten haben mit 0,6 etwa die gleiche Größe und zeigten somit die gleiche Reaktivität. Die annähernd gleichen Reaktivitäten sind schon in der Literatur^[84] beschrieben und basieren darauf, dass diese Monomere sowohl die gleiche Reaktivgruppe, als auch ähnliche Molmassen haben. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass dabei die Wahrscheinlichkeit etwas größer ist, Acrylsäure direkt neben einem Acrylamid zu finden, da der Wert unter 1 liegt. Bei einem Wert von genau 1 liegt eine vollständige statistische Copolymerisation vor. Diese Tendenz ist nicht unerwartet und liegt an der unterschiedlichen Partialladung der Monomere. Durch diese Partialladung der Monomere kommt es zu anziehende elektrostatische Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen sind bei diesen Monomere aber gering und dadurch wird keine alternierende Copolymerisation erhalten.

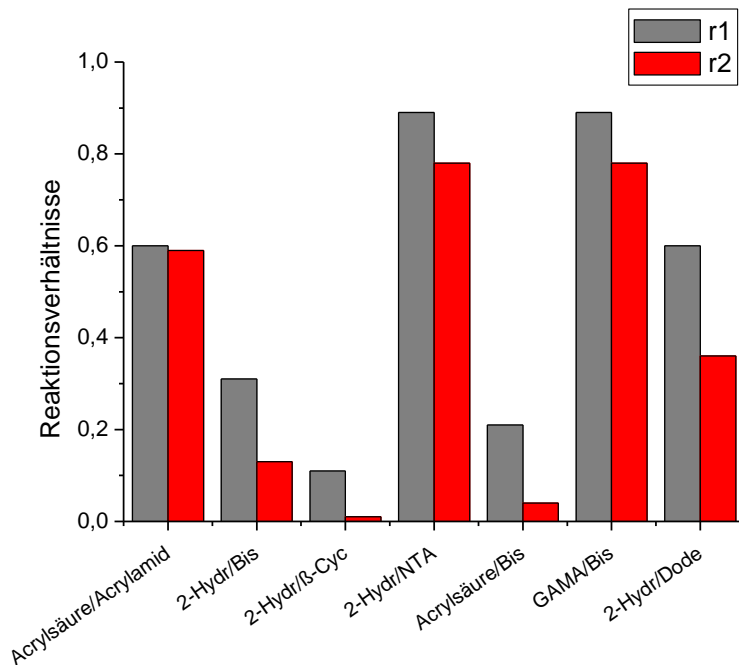


Abbildung 6.1 Auftragung der Reaktionsverhältnisse berechnet durch die Mayo-Lewis Gleichung.

Wie in Abbildung 6.1 zu sehen ist ergeben sich aus den r-Werten von 2-Hydr/NTA und GAMA/Bis ebenfalls statistische Copolymere. Beim Betrachten der reaktiven Gruppe haben alle Monomere die gleiche Methacrylamidgruppe und sollten somit gleich reagieren. Diese Reaktionsfähigkeit wird bei den Monomeren Bis bzw. NTA aber durch die abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen verringert. Daher wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass diese Monomere bevorzugt mit dem „Abstandhalter“-Monomer reagieren und es zu einem alternierenden Copolymer kommt. Daher scheint es zwischen Bis und GAMA bzw. zwischen 2-Hydr und NTA ebenfalls zu abstoßenden Wechselwirkungen zu kommen. Wie genau diese Wechselwirkungen beschaffen sind konnte im Verlauf dieser Arbeit aber nicht geklärt werden. Wenn nun zusätzlich die Anteile der geladenen Monomerbausteine im gesamten Polymer betrachtet werden zeigt sich aber, dass die Wahrscheinlichkeit gering ist zwei Bis bzw. NTA Monomere direkt nebeneinander zu finden. Das liegt daran, dass diese Monomere nur zu einem Anteil von 13% im Polymer vorkommen.

Die Abbildung 6.1 zeigt weiter, dass die für 2-Hydr/NTA und GAMA/Bis erwartete alternierende Struktur nur für einige Mischungen gefunden worden ist. Bei diesen Mischungen ist immer ein geladenes oder sterisch anspruchsvolles Monomer enthalten und zusätzlich ein „Abstandhalter“. Aufgrund der durchweg geringen Menge an geladenem bzw. sterisch anspruchsvollem Monomer in Polymer ist die Anordnung von der Form her nicht klar AB sondern $[A]_n B [A]_n B$. Daher zeigt sich, dass die Anordnungen durch das funktionale

Monomer bestimmt werden. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei der Mischung 2-Hydr/ β -Cyc. Bei dieser Mischung zeigt das β -Cyc nur einen r_2 -Wert von 0,01. Dieser geringe Wert besagt, dass β -Cyc in dieser Mischung so gut wie gar nicht mit weiteren β -Cyc Monomeren reagiert sondern immer das Monomer 2-Hydr bevorzugt. Da auch diese Monomere eine Methacrylamidgruppe als reaktive Gruppe besitzen, wird auch hierbei wieder die Anordnung der Monomerbausteine von den Funktionalgruppen der Monomere bestimmt. Im Fall von 2-Hydr/ β -Cyc ist die große β -Cyclodextringruppe dafür verantwortlich. Durch diese sehr große Gruppe wird die reaktive Gruppe im Polymer effektiv gegen ein weiteres großes Monomer abgeschirmt. Das vergleichsweise kleine Monomer 2-Hydr kann dagegen die reaktive Gruppe erreichen und eine Reaktion eingehen.

Dieser Sachverhalt gilt auch für die Mischung aus 2-Hydr/Dode. Allerdings ist das Monomer Dode nicht so groß wie das β -Cyc Monomer und es kann durch hydrophobe Wechselwirkungen einen Teil seiner sterischen Hinderung ausgleichen. Daher geht bei dieser Mischung auch die Tendenz in Richtung statistischer Copolymerisation. Der r_2 -Wert in Kombination mit dem hohen Anteil an Dode im Polymer zeigt, dass bei dieser Mischung auch zwei Dode Monomerbausteine durchaus nebeneinander liegen können und somit die alternierende Taktizität gestört werden kann.

Bei den restlichen Mischungen mit Bis in Abbildung 6.1 zeigt sich wieder eine klare alternierende Polymerstruktur mit der Anordnung $[A]_nB[A]_nB$. Die Struktur wird hierbei klar vom Monomer Bis bestimmt. Dieses Monomer zeigt aufgrund der Ladungen abstoßende Wechselwirkungen. Zusätzlich ist das Monomer mit seiner Molmasse von 347 g/mol auch nicht klein und zeigt zusätzlich noch eine sterische Hinderung. Durch diese zwei Effekte hat das Bis Monomer die starke Tendenz nicht mit einem weiten Bis zu reagieren. Diese Tatsache in Kombination mit den geringen Bis Anteilen im Polymer lassen auf eine klare alternierende Taktizität bei diesen Mischungen schließen.

Für die Monomerkombination aus Bis und β -Cyc ergibt sich ein Blockcopolymer. Die r -Werte von 3,59 bzw. 12,88 zeigen klar, dass diese Monomere bevorzugt sich selbst reagieren. Diese Blockbildung lässt sich dadurch erklären, dass sowohl das Monomer Bis als auch das Monomer β -Cyc einen recht großen sterischen Anspruch haben. Dadurch wird keins der Monomere bevorzugt eingebaut. Allerdings kommt es zwischen zwei β -Cyc Molekülen jedoch zu einer Wasserstoffbrückenbildung und damit zu anziehenden Wechselwirkungen.^[147,148] Durch diese Wasserstoffbrückenbildung werden die β -Cyc Monomere viel länger zusammen gehalten als ein β -Cyc und ein Bis. Durch diese längere Kontaktzeit reagiert das β -Cyc Monomer in der Mischung β -Cyc/Bis bevorzugt mit sich selbst und bildet einen β -Cyc Block. Worauf dann ein Block aus Bis Monomerbausteinen folgt.

Da die Reaktionsverhältnisse für die ternären Mischungen nicht mit der Mayo-Lewis Gleichung bestimmt werden können, sind diese aus den Daten für die binären Mischungen

abgeschätzt worden. Dabei zeigten wieder die Mischungen mit geladenen oder sterisch anspruchsvollen Monomeren alternierende Anordnungen der $[A]_nB[A]_nC$. Diese Anordnungen basieren wieder auf den Abständen, die nötig sind, um die Wechselwirkungen zwischen den funktionalen Monomeren aufzuheben.

Aufgrund der Daten ist für die Mischung 2-Hydr/Bis/Dode ein statistisches Copolymer am wahrscheinlichsten. Diese Annahme beruht auf den stark abstoßenden Wechselwirkungen zwischen den Bis Monomeren und den annähernd gleichen Reaktivitäten des 2-Hydr und des Dode.

Tabelle 6.4 Zusammensetzung der Copolymere und die wahrscheinlichste Anordnung.
stat. = statistisches Copolymer, alt. = alternierendes Copolymer und Block = Block-copolymer

Monomer 1 [m1]	Monomer 2 [m2]	Monomer 3 [m3]	Polymer [wt m1/wt m2/ wt m3]	Anordnung
Acrylsäure	Acrylamid		50/50	stat.
2-Hydr	Bis		95/5	alt.
2-Hydr	β -Cyc		89/11	alt.
2-Hydr	NTA		87/13	stat.
Acrylsäure	Bis		80/20	alt.
β -Cyc	Bis		78/22	Block
GAMA	Bis		87/13	stat.
2-Hydr	Dode		50/50	stat.
2-Hydr	Bis	β -Cyc	86/4/10	alt.
2-Hydr	Bis	β -Cyc	91,5/2,5/6	alt.
GAMA	Bis	β -Cyc	89/4/4	alt.
GAMA	Bis	β -Cyc	88,5/3,5/8	alt.
2-Hydr	Bis	NTA	83/6/11	alt.
2-Hydr	Bis	NTA	82/6/12	alt.
GAMA	Bis	NTA	88/3/9	alt.
GAMA	Bis	NTA	89/3/8	alt.
2-Hydr	Bis	Dode	47.5/47.5/5	stat.

Abhängigkeit vom Basismaterial

Hierbei werden die DG-Werte der PET- und der Cellulose Membranen diskutiert. Dieser Vergleich zeigt, dass es generell einige Unterschiede zwischen den PET- und den Cellulose Membranen gibt. Diese sind aber in den ersten Tests nicht gefunden worden. Bei diesen Tests ist die Abhängigkeit des DG-Werts von der Monomerlösung untersucht worden. Diese Untersuchung ist mit 2-Hydr/Bis durchgeführt worden (Abb.5.20 und 5.25). Die dabei ermittelten Unterschiede liegen im Bereich des Messfehlers. Daher ist nach diesem Test angenommen worden, dass sich die Membranen bei den Ppropf-Polymerisationen gleich verhalten. Bei den weiteren Messungen zeigt sich jedoch, dass diese Annahme nur für

einige Monomermischungen stimmte. Die Mischungen aus β -Cyc, β -Cyc / Dode, β -Cyc / Ammo, Ammo und NTA zeigen auf Cellulose größere DG-Werte. Alle anderen getesteten Monomermischungen zeigen auf den PET-Membranen größere DG-Werte.

Für die Monomermischungen mit β -Cyc ist der größere DG-Wert mit der chemischen Ähnlichkeit von der Cellulose und dem β -Cyclodextrin Ring zu erklären. Durch diese Ähnlichkeit kommt es zur Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Cellulose und dem β -Cyclodextrin Ring.^[147,148] Durch diese Wasserstoffbrücken werden die β -Cyc Monomere an der Membranoberfläche gehalten und können leichter polymerisieren, was aber nur den Start der Polymerisation beeinflusst, wie die Ergebnisse der Polymerzusammensetzungen zeigen (Tab.5.5).

Auch beim Monomer Ammo kann der größere DG-Wert auf den Cellulose Membranen durch attraktive Wechselwirkungen erklärt werden. Diese Wechselwirkungen finden zwischen der Amin-Gruppe und den OH-Gruppen der Cellulose statt. Diese Wechselwirkungen gibt es zwar auch auf den PET-Membranen, allerdings ist die Anzahl der OH-Gruppen auf der Cellulose deutlich größer.^[149] Dadurch können auch erheblich mehr Wechselwirkungen stattfinden, was wieder zu einem schnelleren Start der Polymerisation führt.

Wasserstoffbrücken werden ebenfalls von den Monomeren Bis und NTA zur Celluloseoberfläche aufgebaut. Auch bei diese Monomeren ist der höhere DG-Wert bei einigen Copolymeren auf Cellulose darauf zurückzuführen.^[148,149]

Die DG-Wert Erhöhungen auf den PET-Membranen sind auf ähnliche Effekte zurückzuführen. Allerdings sind für diese Membranen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Benzolring im PET und den jeweiligen Monomeren verantwortlich.^[150] Jedes Monomer bzw. jede Monomermischung, die höhere DG-Werte auf den PET-Membranen zeigt, beinhaltet Benzolringe, Cyclohexylringe oder eine recht lange Alkylkette. Bei diesen Pfropf-Polymerisationen kommt es dann zu einer Akkumulation der Monomere an der Membranoberfläche. Diese Akkumulation wird durch hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufen und dadurch wird wiederum das Kettenwachstum der Polymere beschleunigt. Die Monomermischungen, welche annähernd gleiche DG-Werte auf PET-, und Cellulose Membranen haben, beinhalteten jeweils ein Monomer, das Wechselwirkungen zu Cellulose und zu PET eingehen kann. Daher wird auf jeder Oberfläche eine Akkumulation von einem Monomer erhalten. Durch diese Akkumulation wird dann der Reaktionsstart auf der jeweiligen Oberfläche beschleunigt. Da diese Beschleunigung auf beiden Oberflächen stattgefunden hat, ist kein Unterschied zwischen den Membranmaterialien festgestellt worden. Wie sich dieser Einfluss auf die Zusammensetzung der Copolymere auswirkt konnte nicht ermittelt werden, da die Copolymerzusammensetzung und damit verbunden die Reaktivität nur auf den Cellulose-Membranen ermittelt werden konnte.

Trotz des erwarteten Einflusses der Membran zeigt sich auch bei diesen Messungen wieder, dass der Haupteinfluss auf die Polymerisation durch die Monomere gegeben ist. Der Einfluss des Basismaterials ist erwartet worden, da ein solcher Einfluss schon häufiger in der Literatur beschrieben worden ist.^[148,149,150]

6.2.3 Änderung der Oberflächeneigenschaften

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (Abb. 5.17) zeigen einen starken Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Hydrophilie der Membranen. Dieses Ergebnis ist erwartet und erwünscht, da die Oberflächeneigenschaften durch die Funktionalisierungen verändert werden sollten. Der Referenzwert für die Basismembran ist der selbe Werte, der in der Literatur beschrieben worden ist.^[124]

Benetzungseigenschaften

Jede Änderung der Oberfläche hat dabei auch zu einer Veränderung des Kontaktwinkels geführt und diese zeigen in der Regel die erwarteten Tendenzen. So sind die Membranen durch die Aminolyse hydrophiler und nach der Photoinitiatorimmobilisierung hydrophober geworden. Auch bei der Pfropfung mit den Homopolymeren sind die erwarteten Tendenzen gefunden worden. Hierbei zeigen mit hydrophoben Monomeren funktionalisierte Membranen auch hydrophobe Oberflächen. Während mit den hydrophilen Monomeren hydrophile Oberflächen erzeugt worden sind.

Bei den Copolymeren zeigen sich hingegen einige Abweichungen von den erwarteten Kontaktwinkeln. Die erwarteten Tendenzen sind für die Mischungen aus Bis / Dode und β -Cyc / Dode gefunden worden. Die Kontaktwinkel liegen bei diesen Mischungen zwischen denen der Homopolymere. Daraus folgt dann, dass jede Spezies auf der Oberfläche vorliegt. Die anderen Co-Polymere zeigen Kontaktwinkel, die nicht den Erwartungen entsprachen. Für die Mischung aus Dode und Ammo ist der Kontaktwinkel nur vom Dode beeinflusst worden. Aus den vorherigen Daten (Abschnitt 6.2.2 Zusammensetzung der Copolymere) zeigt sich aber auch, dass die Reaktivität von Monomer Dode deutlich größer ist als die von Ammo, wodurch das Polymer zu einem Großteil aus Dode bestehen dürfte. Daher ist dieses Verhalten nicht überraschend. Da das Polymer größtenteils aus Dode besteht ist auch noch davon auszugehen, dass es auf der Membranoberfläche bei hydrophilen Bedingungen als kollabiertes Knäuel vorliegt.^[143] Durch diesen großen Anteil an Dode wird der Einfluss der hydrophilen Ammo-Einheiten unterdrückt und es können nur sehr geringe Mengen an Wasser von den Ammo-Monomereinheiten gebunden werden.

Ebenfalls einen höheren Kontaktwinkel als erwartet zeigen die Membranen, welche mit Ammo und Bis funktionalisiert worden sind. Diese Membranen hatten dabei einen größeren Kontaktwinkel als jedes der Homopolymere. Durch die unterschiedlichen Ladungen innerhalb

eines Polymers kommt es zu attraktiven Wechselwirkungen innerhalb einer Polymerkette bzw. zwischen den Polymerketten. Diese Interaktionen zwischen den Polymerketten bewirken ein physikalisches Vernetzen der Polymere. Durch diese Vernetzung sind diese Polymere nur noch begrenzt quellfähig. Diese vergleichsweise geringe Quellung bewirkt, dass weniger Wasser mit den Polymerketten wechselwirken kann, da diese elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten nicht vom Wasser gebrochen werden können. Das führt wiederum zu einem höheren Kontaktwinkel als bei den Homopolymeren.^[144]

Im Gegensatz dazu wird die Hydrophilie durch die Co-Polymerisation von β -Cyc mit den geladenen Monomeren verstärkt. Diese Verstärkung ist auf das sterisch anspruchsvolle Monomer β -Cyc zurückzuführen. Durch das sterisch anspruchsvolle β -Cyc Monomer werden Polymer Knäuele erhalten, die wenig Wechselwirkung mit den anderen Polymerketten eingehen.^[144] Diese Knäule können im kollabierten Zustand keine dichten Packungen eingehen was dazu führt, dass diese Polymerknäule gut vom Wasser zu benetzen sind. Dadurch können diese Polymere besser quellen. Diese verbesserte Quellung führt dazu, dass Wasser schneller aufgenommen wird und es werden niedrige Kontaktwinkel erhalten.

Einfluss der Schichtdicke im trockenen und gequollenen Zustand

Als weitere Methode zur Bestimmung der Oberflächeneigenschaften ist die Permporometrie verwendet worden. Damit soll die Schichtdicke der Polymere bestimmt werden. Als Referenz dienen die PET-Basismembranen. Für diese Membranen ist dabei ein um 57,5% größerer Durchmesser gefunden worden als vom Hersteller angegeben. Dieser größere Porendurchmesser ist aber schon mehrfach in der Literatur beschrieben worden und daher nicht überraschend.^[2,49,82]

Bei den weiteren Messungen der Permporometrie sind die erwarteten Ergebnisse erhalten worden (Tabelle 5.3). Diese Ergebnisse zeigen erst eine Vergrößerung der Poren durch den Ätzvorgang mit Amin. Diese Vergrößerung ist zu erwarten gewesen, da im Herstellungsverfahren der Kernspurmembranen der Porendurchmesser auch durch einen Ätzvorgang eingestellt wird.^[89] Durch die Pfropf-Polymerisationen ist der Porendurchmesser, wie erwartet wieder verringert worden. Dabei zeigt sich, dass die Verringerung mit größerem DG-Wert stärker ausfällt. Die maximalen Schichtdicken betragen 28 nm und sind damit geringer als die Vergrößerung, die durch das Amin erreicht worden ist.

Entgegen der Permporometrie zeigt die Permeabilität keine Abhängigkeit vom DG-Wert. Allerdings zeigt sich eine starke Abhängigkeit von den Beschichtungen selbst. Dabei fällt zuerst auf, dass die Erhöhung der Permeabilität, durch die Behandlung mit Amin, mit 10% genauso groß ausfällt wie die Zunahme des Porendurchmessers. Diese Abhängigkeit ist nach den Pfropf-Polymerisationen nicht mehr zu finden. Hierbei sind nur Abhängigkeiten von

den verwendeten Monomeren gefunden worden. Diese Abhängigkeiten sind auf die Veränderung der Hydrophilie der Membranoberfläche zurückzuführen. Dabei zeigt sich, dass Membranen mit einer hydrophoben Oberfläche eine 30% geringere Permeabilität aufweisen als die Membranen mit hydrophiler Oberfläche. Dieser Unterschied kann durch die Verringerung der Benetzbarkeit der Poren, durch das Wasser, erklärt werden.^[145] Durch die Verringerung der Benetzbarkeit wird zwar die Grenzflächenenergie verringert aber gleichzeitig der Einfluss der Oberflächenspannung vergrößert. Kann sich eine Pore aufgrund der schlechteren Benetzbarkeit nicht selbstständig mit Wasser füllen bildet sich aufgrund der Oberflächenspannung ein Wasserfilm oberhalb der Pore. Dieser Film muss dann mit Hilfe eines höheren Drucks in die Pore gepresst werden. Dieser Einfluss vergrößert sich je kleiner die Poren sind (Abschnitt 4.4). Da die Membran sehr viele kleine Poren besitzt muss dann für die gleiche Permeabilität ein höherer Druck aufgebracht werden.^[146] Als Ausnahme zeigen sich die Membranen mit der Beschichtung Dode/Ammo. Diese haben einen Kontaktwinkel von $>90^\circ$ und damit eine hydrophobe Oberfläche. Allerdings ist eine recht hohe Permeabilität bei diesen Membranen gefunden worden. Diese vergleichsweise hohe Permeabilität könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Benetzbarkeit der Oberfläche vom Ammo beeinflusst wird und sich dadurch kein Wasserfilm oberhalb der Pore bildet. Allerdings konnte bisher noch nicht geklärt werden, warum dieser Effekt bei den Permeabilitätsmessungen auftritt aber bei den Kontaktwinkelmessungen nicht.

6.2.4 Erhöhung des DG-Werts, Titerplatten-Prozedur

Die Erhöhung des DG-Werts ist auf drei Arten durchgeführt worden. Dabei sollten mit Hilfe einer größeren Monomer-Konzentration, einer längeren UV-Zeit und durch eine Änderung der Polymerstruktur der DG-Wert angehoben werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abschnitten 5.6 und 5.6.1 dargestellt. Generell zeigt sich dabei, dass eine Erhöhung des DG-Werts mit allen drei Versionen möglich ist.

Änderung der Bestrahlungszeit und der Monomerkonzentration

Für das Monomer 2-Hydr zeigt sich, dass die Polymerisation über die gesamte Bestrahlungszeit nicht gebremst worden ist. Woraus sich ergibt, dass sich 2-Hydr Monomere während der Polymerisation nicht negativ beeinflussen. Dieses Ergebnis wird durch die Abhängigkeit von der Monomerkonzentration gestützt. Bei diesem Test ist eine exponentielle Abhängigkeit gefunden worden. Die Reaktion ist dabei bei zunehmender Monomerkonzentration beschleunigt worden. Diese Beschleunigung beruht darauf, dass mehr Monomere während der Reaktion zur Verfügung stehen. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit deutlich, dass ein Monomer auf ein aktiviertes Radikal auf der Membranoberfläche trifft und eine Reaktion eingeht.

Diese Tendenz konnte bei dem „besten Adsorbern“ nicht beobachtet werden. Die Erhöhung ist nur bis zu einem gewissen Grad möglich. Es ist sowohl für die Variation der Monomerkonzentration, als auch für die UV-Zeit und für die Änderung der Polymerstruktur ein Grenzwert erreicht worden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Membranoberfläche ab diesem DG-Wert soweit mit Polymer bedeckt ist, dass sich eine stark negativ geladene Oberfläche ergibt. Durch diese negative Ladung auf der Oberfläche werden die Monomere von dieser abgestoßen und es kann keine weitere Polymerisation stattfinden. Bei der Variation der Monomerkonzentration ist der maximale DG-Wert nur bei der mittleren Konzentration von 200 g/L erreicht worden. Die höheren und niedrigeren Konzentrationen zeigten geringere Werte. Daraus lässt sich ableiten, dass bei der geringen Konzentration die Monomerdichte nicht groß genug ist, um mehr Polymer auf die Oberfläche zu pflöpfen. Bei der hohen Konzentration sind vermutlich zu viele gleiche Ladungen in der Reaktionslösung vorhanden. Dadurch kommt es zu einer ständigen Beeinflussung der Monomere untereinander und die Verweilzeit der Monomere auf der Oberfläche wird verringert. Durch diese verkürzte Verweilzeit haben weniger Monomere mit der Oberfläche reagieren können und der DG-Wert verringert sich.

Auch bei der UV-Zeit zeigt ein mittlerer Wert von 60 min die höchsten DG-Werte. Daraus ergibt sich, dass die UV-Zeiten unter 60 min zu kurz sind, um eine vollständige Polymerisation zu erreichen. Bei der höheren UV-Zeit von 120 min kommt es hingegen wahrscheinlich zu einer Degradierung der Polymere. Diese Degradierung ist dadurch bedingt, dass sich die Menge an Monomerlösung nach dieser Zeit durch Wärmeentwicklung stark verringert hat. Die Kombination aus permanenter UV-Bestrahlung und einer deutlich erhöhten Temperatur erleichtert die Spaltung von Polymerketten oder eine Abspaltung von Funktionalgruppen, wodurch der DG-Wert wieder verringert wird.^[157]

Änderung der Polymerstruktur

Auch mit der Änderung der Polymerstruktur zu „Kamm ähnlichen“-Strukturen kann der DG-Wert nur bis zu einem Grenzwert erhöht werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abschnitt 5.6.1 aufgetragen. Hierbei zeigt sich, dass der DG-Wert der „Rückgrat“-Polymere abhängig von der Photoinitiatordichte und von der UV-Zeit ist. Alle getesteten „Rückgrat“-Polymere zeigen beim Pflöpfen auf die Membranoberfläche die gleichen Tendenzen wie das Monomer 2-Hydr. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die Monomere während der Polymerisation nicht oder nur geringfügig beeinflussen.

Für die weitere Polymerisation zeigen sich jedoch starke Abhängigkeiten von der Pflöpfendichte und vom „Rückgrat“-Polymer selbst. Für die Monomere HEMA und 2-Hydr ist dabei ermittelt worden, dass ein großer DG-Wert des „Rückgrat“-Polymers zu kleineren DG-Werten des „besten Adsorbers“ führte. Das heißt, dass bei einem großen DG-Wert dieser

„Rückgrat“-Polymere, die Kettenlänge der „besten Adsorber“-Polymere eingeschränkt worden ist und damit verbunden auch der DG-Wert. Daher sind für die hohen Pfropfdichten des „Rückgrat“-Polymers nur geringe DG-Werte für den „besten Adsorber“ gefunden worden. Bei den niedrigen Pfropfdichten konnten die Polymere etwas längere Ketten bilden, da der Abstand zwischen den „Rückgrat“-Polymere etwas größer gewesen ist. Dieser Effekt ist besonders stark bei HEMA als „Rückgrat“-Polymer ausgeprägt.

Das „Rückgrat“-Polymer aus HEMA / DMAPAA zeigt hingegen eine unterschiedliche Tendenz. Der DG-Wert des „besten Adsorbers“ wird mit zunehmendem DG-Wert des „Rückgrat“-Polymers größer. Dieses Verhalten ist auf das partiell positiv geladene DMAPAA zurückzuführen. Das DMAPAA kann dabei mit den Monomeren Bis und β -Cyc attraktive Wechselwirkungen eingehen. Diese Wechselwirkungen sind dabei von elektrostatischer Natur und finden zwischen der Amingruppe im DMAPAA und der geladenen Phosphat-Gruppe im Bis bzw. mit dem β -Cyclodextrin Ring im β -Cyc statt. Diese Wechselwirkungen führen dazu, dass die Monomere an der Polymeroberfläche akkumuliert werden. Durch diese Akkumulation ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein Monomer mit der Oberfläche reagiert. Dadurch konnte die Polymerisation wieder besser gestartet werden, was zu mehr Polymerketten führt. Aber auch hierbei zeigt sich, dass die Polymere zwischen den Ketten nur eine gewisse Größe erreichen können. Daher zeigt sich der DG-Wert auch abhängig von der Kettenlänge des „Rückgrat“-Polymers. Je kürzer die Kettenlängen sind, desto weniger Polymerketten des „besten Adsorbers“ konnten gebildet werden. Aufgrund der Ergebnisse konnte die Polymerisation von „Kamm ähnliche“-Strukturen als erfolgreich angesehen werden.

Titerplattenprozedur

Weiterhin ist bei der Titerplattenprozedur der Einfluss des Membrandurchmessers auf die Pfropf-Polymerisation untersucht worden. Die Ergebnisse der Messung sind in Abschnitt 5.6.2 beschrieben und es zeigt sich, dass es keine Unterschiede zwischen den 47 mm Membranen und den 5 mm Membranen gibt. Die Modifizierungen sind bei jeweils gleichen Bedingungen durchgeführt worden. Die Abweichungen der einzelnen Messungen haben dabei immer im Bereich des Messfehlers gelegen. Das zeigt, dass der immobilisierte Photoinitiator nicht durch die Membrangröße beeinflusst wird. Da die Initiierung nur auf der Membranoberfläche stattfindet, kommt es zur gleichen Reaktion, die nur in einer anderen Größenordnung verläuft.

6.3 Protein Adsorption

Ausgangsbedingungen

Die Ausgangsbedingungen sind wie folgt gewählt worden: Für die Adsorptionen wird eine Proteinlösung verwendet, die bei einem pH-Wert von 7 mit HEPES gepuffert ist. Dieser Puffer hat dabei eine Konzentration von 25 mM. Dadurch werden die Adsorptionen in einer recht salzarmen Umgebung durchgeführt. In dieser Umgebung haben Proteine unterschiedliche Ladungen. Die Nettoladung des IgG und des Lysozyms sind dabei nominell positiv, da der isoelektrische Punkt dieser Proteine größer als pH 7 ist. Das HSA hat dagegen einen isoelektrischen Punkt von pH 5 und damit verbunden unter den Adsorptionsbedingungen eine negative Ladung. Auch im generellen Aufbau unterscheiden sich die Proteine. Während IgG aus verschiedenen Ketten und Segmenten besteht (Abschnitt 2.1) besteht HSA aus einer langen Kette die aus 585 Aminosäuren besteht. Die Anordnung dieser Kette bewirkt beim HSA eine globuläre Struktur, während die Struktur des IgG an ein Y erinnert.^[160,162] Beide Proteine haben dazu noch unterschiedliche Domänen mit einer anderen Ladungsdichte und unterschiedlichen Mengen an hydrophoben bzw. hydrophilen Aminosäuren. Diese Domänen sind in der Literatur beschrieben.^[15,16,160,162]

Die Bedingungen der Waschschritte und der Adsorption sind dabei gleich. Im Gegensatz dazu wird die Desorption in einer salzreichen Umgebung durchgeführt. Diese sorgt dafür, dass elektrostatische Wechselwirkungen gebrochen werden und das gebundene Protein eluiert wird. Vom Mechanismus her besetzen dabei die Ionen der Salzlösung die Bindungsstellen am Protein und am Polymer. Diese geschieht aufgrund einer höheren Affinität zu den kleinen Salzionen. Durch die Ionen werden dann die möglichen Bindungsstellen gesättigt und die Bindung zwischen Protein und Polymer wird gebrochen. Die dafür nötige Salzkonzentration hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen ist die Konzentration davon abhängig wie der Adsorber beschaffen ist. Einfache Ionenaustauscher verhalten sich dabei oft anders als zwiterionsche Adsorber. Außerdem spielt die Art des Salzes eine Rolle. Dabei verhalten sich chaotrope Salze anders als kosmotrope. Häufig können dabei Chaotrope Salze in einer geringeren Konzentration eingesetzt werden als Kosmotrope Salze. Die Salzkonzentration ist daher von System abhängig. Häufig werden aber für Kosmotrope Salze wie Natriumchlorid konzentrationen von >400 mM verwendet.

[49,56,166]

6.3.1 Einfluss auf die Adsorption

Einfluss des Basismaterials

Die Ergebnisse der Protein Adsorption für die PET- und Cellulose Membranen sind in Abschnitt 5.41 und 5.42 aufgetragen und zeigen einige Unterschiede zwischen den Basismaterialien. Besonders bei der Bedeckung der Membranoberfläche gibt es deutliche Unterschiede. Bei der Bedeckung der Oberfläche mit Protein spielen die errechneten Monoschichtkapazitäten eine große Rolle. Diese sind aus der Oberfläche der Membranen und der Größe des IgGs bestimmt worden. Dabei ist die theoretische Kapazität der PET-Membranen mit 2,8 mg/ml Membran um den Faktor 2,8 kleiner als die Kapazität der Cellulose Membranen. Bei den Messungen ist für die jeweils beste Beschichtung eine Monoschicht-Kapazität für die PET Membranen, aber nur eine 2/3 Monoschicht auf den Cellulose Membranen gefunden worden.

Eine Erklärung dafür liefert die BET-Messmethode (Abschnitt 4.4.5) mit der die spezifischen Oberflächen bestimmt worden sind. Dabei erfolgt die Bestimmung der Oberfläche durch die Adsorption von Stickstoff bei kryogenen Temperaturen. Bei diesen Temperaturen kann der Stickstoff in Poren von weniger als 1 nm eindringen und diese mit in die spezifische Oberfläche einbeziehen.^[129,130] Die Messungen (Tab.6.3) zeigen, dass die Cellulose-Membranen deutlich mehr Poren im Bereich von wenigen Nanometern aufweisen als die PET-Membranen. Damit ist die spezifische Oberfläche der Cellulose Membranen stärker durch diese kleinen Poren beeinflusst. Durch die Pfropf-Polymerisation ist ein großer Teil dieser Kavitäten und Mikroporen durch Polymer verschlossen worden, wodurch sich die spezifische Oberfläche verringert. Dieser Effekt ist also bei den Cellulose Membranen deutlich ausgeprägter als bei den PET-Membranen und dadurch ist bei den PET-Membranen die theoretische Kapazität erreicht worden, nicht aber bei den Cellulose Membranen.

Tabelle 6.3 Porenvolumen Verteilung der PET- und der Cellulose-Membranen ermittelt durch BET-Messungen. Die BET-Messung erfasst alle Poren bis 100nm.

	PET-400	RC 60
Porendurchmesser [nm]	Porenvolumen [ml/g]	Porenvolumen [ml/g]
0-6	0,00027	0,00357
6-12	0,00027	0,00251
12-20	0,00012	0,00119
20-80	0,00015	0,00044
>80	0,00015	0,00060
Total	0,00097	0,00830

Einfluss der Polymerstruktur

Das aufgebrachte Polymer zeigt einen sehr starken Einfluss auf die Adsorbereigenschaften der Membranen. Durch die unterschiedlichen Beschichtungen sind dabei „gute Adsorber“, „schlechte Adsorber“ und sogar Beschichtungen, welche die Kapazität der Basismembranen verringern, gefunden worden. Dabei zeigte sich, dass diese Eigenschaften unabhängig vom Basismaterial der Membranen gewesen sind. Als gute Adsorber werden dabei die Polymerbeschichtungen bezeichnet welche die Kapazität und die Selektivität der Basismembran erhöhen. In Gegensatz dazu sind schlechte Adsorber die Materialien die keinen bzw. einen negativen Einfluss auf die Kapazität und Selektivität der Basismembran haben.

Die Kapazitäten der Membranen sind dabei wie in Abschnitt 4.7 beschrieben durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abschnitt 5.4 zu finden.

Die Bestimmung der Selektivitäten ist auf unterschiedliche Arten erfolgt. Im ersten Schritt sind Screeningtests mittels Elektrophorese (Abschnitt 5.5.2) durchgeführt worden. Diese Tests zeigen, welche Membranen überhaupt eine IgG Selektivität haben. Dabei zeigt sich, dass nur 12 der 38 verschiedenen Modifizierungen eine IgG-Selektivität aufweisen.

Für die quantitativen Messungen ist im weiteren Verlauf nur mit einer begrenzten Anzahl an Beschichtungen gearbeitet worden. Die Ergebnisse der statischen Messungen sind dabei in den Abschnitten 5.5.1 und 5.5.3 aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass die Selektivitäten bei den Einzelmessungen durchschnittlich geringer gewesen sind als bei den Mischungsmessungen. Das war darauf zurückzuführen, dass es während der Mischungsmessungen eine Konkurrenz zwischen den Proteinen um die Bindungsplätze gibt. Allerdings ist der Hauptunterschied erst nach dem Waschvorgang gefunden worden. Für die Adsorption sind die Selektivitäten für beide Methoden in etwa gleich, auch zeigen sich die gleichen Tendenzen wie bei den Elektrophorese-Messungen. Nach dem Waschvorgang ist jedoch ein großer Unterschied zu finden. Ähnliche Tendenzen zeigen auch die dynamischen Messungen in Abschnitt 5.5.4.

Im weiteren Verlauf sind auch noch Einzelmessungen mit Lysozym als Referenz durchgeführt worden (Abschnitt 5.5.1). Die Messungen mit Lysozym werden nur als Einzelmessungen durchgeführt, da nach den Mischungsmessungen kein IgG mehr in den Mess- und der Referenzlösung nachgewiesen werden konnte und dadurch keine sinnvollen Ergebnisse bei den Mischungsmessungen erhalten worden sind. Der genaue Mechanismus, der dazu führte, konnte nicht ermittelt werden.

Referenz Materialien

Als Referenz Materialien sind die Basismembranen und die Membranen mit konventionellem Ionenaustauscher betrachtet worden. Dabei werden die PET- und Cellulose-Basismembranen als Ausgangspunkt für die Kapazitäten und die Selektivitäten verwendet. Mit den Ionenaustauscher-Membranen sollen gezeigt werden, dass die Funktionalpolymere mehr Wechselwirkungen zum IgG eingehen als einfache elektrostatische Wechselwirkungen. Die Basismembranen aus PET und Cellulose verhalten sich annähernd gleich. Für beide Materialien ist die gleiche normierte Ausgangskapazität von 1 mg/ml Membran gefunden worden. Ebenso zeigten diese Membranen wie erwartet keine Selektivität bei den Screening-Tests.

Weiterhin zeigt sich aber auch für die Basismembranen eine Erhöhung der Selektivität nach dem Waschvorgang. Die Erhöhung ist zwar unerwartet, lässt sich aber dadurch erklären, dass die OH-Gruppen der Cellulose bevorzugt mit einer positiv geladenen Oberfläche wie beim IgG wechselwirken.^[160,162]

Die Ionenaustauscher zeigen alle ein leicht unterschiedliches Verhalten von AMPS und VS bzw. VP. Durch diese Beschichtungen wird wie erwartet die Kapazität erhöht. Die Erhöhung ist dabei abhängig vom Material. AMPS gibt die größten Kapazitäten während die Kapazitäten von VS und VP etwa um den Faktor zwei kleiner sind. Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass der DG-Wert von AMPS um den Faktor zwei größer ist und das Material somit längere Polymerketten besitzt womit es mehr Proteine Binden kann.

Weiterhin unterscheiden sich die Membranen mit AMPS, VS und VP auch bei den Selektivitätsmessungen. Dabei zeigen die Membranen mit AMPS wie erwartet keine Selektivitäten. Dieses Ergebnis ist für alle durchgeführten Messungen gefunden worden und entspricht den Erwartungen. Da AMPS als reiner Ionenaustauscher nur elektrostatische Wechselwirkungen mit den Proteinen eingehen sollte, ist nur eine geringe bis gar keine Selektivität erwartet worden. Auch die Sorptionskonstanten zeigen gleiche Werte für das AMPS wie in der Literatur beschrieben Ionenaustauscher.^[138] In Gegensatz dazu zeigen die Membranen mit VS und VP aber eine Selektivität zum IgG. Diese Selektivitäten liegen im Moderaten Bereich von $\alpha=2$, werden für das VS aber bei den Mischungsmessungen verstärkt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Membranen zeigen die mit der Modifizierung aus 2-Hydr/VP keine Änderung der Selektivität bei den Mischungsmessungen. Das ist nicht zu erwarten gewesen, da sowohl die Membranen mit 2-Hydr/VS als auch mit 2-Hydr/VP die gleichen Soptionskonstanten nach dem Waschvorgang aufweisen und ähnliche Ergebnisse bei der Einzelmessmethode zeigen. Aufgrund der chemischen Struktur der Vinylphosphonsäure kann nicht erklärt werden, warum nicht mehr HSA ausgewaschen worden ist. Auch konnte nicht geklärt werden warum sich AMPS und VS trotz gleicher

Sulfonsäuregruppe so deutlich unterscheiden. Es könnte aber darauf schließen lassen, dass die Monomere eine unterschiedliche Ionenstärke aufweisen. In der Literatur wird beschrieben, dass auf einer Oberfläche immobilisierte Polyacrylsäure Unterschiede bei der Adsorption von BSA und Lysozym aufweist wenn die Ionenstärke variiert wird.^[167] Dabei wird die Selektivität von BSA zum Lysozym mit Erhöhung der Ionenstärke verschoben. Ein ähnlicher Effekt könnte hierbei auch die Adsorption von HSA an das AMPS beeinflussen. Dabei kann die Ionenstärke der Sulfonsäuregruppe im AMPS durch die zusätzliche Amidgruppe verändert werden. Diese Veränderung führt dann zu einer höheren Affinität zum HSA als bei der VS.

Bei den dynamischen Messungen sind für die Basismembran und die Ionenaustauschermembranen keine Selektivitäten und kein Unterschied zwischen den Einzel- und den Mischungsmessungen gefunden worden. Es zeigt sich, dass elektrostatische Wechselwirkungen allein nicht ausreichend sind, um ein Protein selektiv bei strömenden Bedingungen zu binden.

Auch die Messungen mit Lysozym als zweites Protein zeigen keine Selektivität für die Basismembran und die 2-Hydr/AMPS Membranen. Da Lysozym und IgG eine ähnliche Oberflächenladung aufweisen, sollte durch reine elektrostatische Wechselwirkungen keine Selektivität erreicht werden.^[50]

Allerdings sind für die Ionenaustauscher 2-Hydr/VS und 2-Hydr/VP geringe Selektivitäten gefunden worden. Dabei wird die Selektivität vermutlich durch mehr mögliche Bindungsstellen am IgG beeinflusst. Am größeren IgG können mehr Polymerketten binden als an einem vergleichsweise kleinen Lysozym. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein eingefangenes Protein auch auf der Oberfläche fixiert bleibt und sich nicht wieder löst. Zusätzlich spielte die Kettenlänge der Pfropf-Polymere eine Rolle. Die Molmasse der Ionenaustauscher und der „besten Adsorber“ sind aus den Daten für die Pfropfdichte und den DG-Werten berechnet worden. Als Grundlage dafür werden die bekannten Pfropfdichten (Tab. 5.4) als konstant angenommen. Ebenfalls bekannten sind DG-Werte und die entsprechenden Molmassen für das Polymer aus 2-Hydr. Mit der konstanten Pfropfdichte und den bekannten DG-Werten für die „besten Adsorber“ und die Ionenaustauscher Membranen ist dann über einen einfachen Dreisatz die Molmasse der „besten Adsorber“ und der Ionenaustauscher bestimmt worden. Die aus DG und Pfropfdichte berechnete Molmasse ist für die die Ionenaustauscher 2-Hydr/VS und 2-Hydr/VP mit ca.110 kg/mol in Vergleich zum AMPS mit 227 kg/mol recht gering. Dadurch konnten weder IgG noch das kleinere Lysozym tief genug eindringen, um eine weitere kinetische Stabilisierung zu erfahren.

Gute Adsorber

Wie bereits erwähnt werden als gute Adsorber die Polymerbeschichtungen bezeichnet welche die Kapazität und die Selektivität der Basismembran erhöhen. Die guten Adsorber sind dabei aus den ersten Screening Tests hervorgegangen und sind im weiteren Verlauf der Arbeit zu den „besten Adsorbern“ weiterentwickelt worden.

Eine gute Adsorptionsfähigkeit zeigen dabei die Polymere mit Bis, welches elektrostatische Wechselwirkungen zum Protein eingehen kann. Weiterhin werden diese Wechselwirkungen durch ein weiteres Monomer wie β -Cyc oder Dode unterstützt, was auf spezifische Selektivitäten zurückzuführen ist.^[113,115]

Diese spezifischen Wechselwirkungen sind dabei abhängig vom eingesetzten Monomer. Für β -Cyc handelt es sich um aminophile Wechselwirkungen. Das heißt, dass β -Cyc bevorzugt Wechselwirkungen mit Aminosäuren wie Asparagin, Glycin, Asparagin, Arginin und Lysin eingeht. Diese Wechselwirkungen selbst sind nicht sehr stark, unterstützen aber die elektrostatischen Wechselwirkungen vom Bis. Dadurch zeigen besonders die Mischungen für Bis/ β -Cyc eine starke Bindung der Proteine auf der Membranoberfläche.

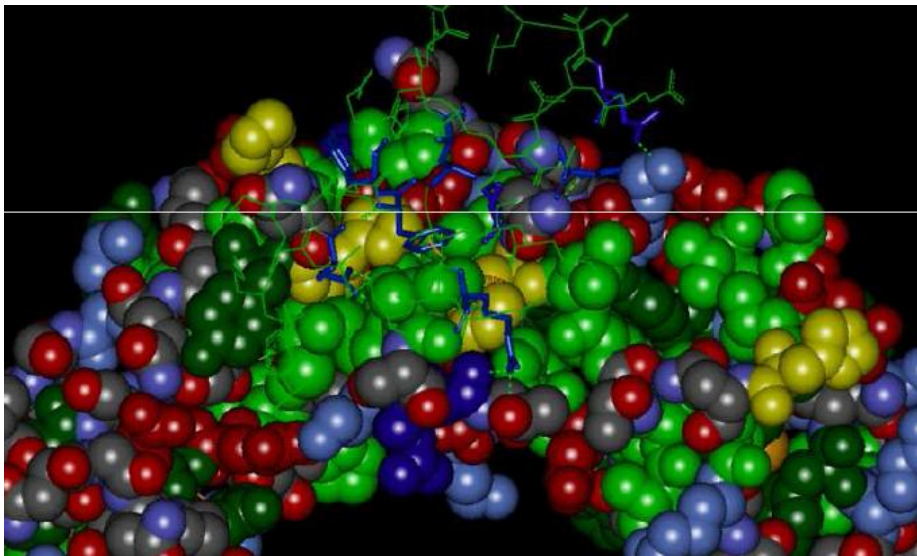


Abbildung 6.2 Kristallstruktur von IgG mit Protein A an der Bindungsdomäne^[169]

Für diese Polymere zeigt sich auch eine IgG-Selektivität bei allen Messungen. Dabei zeigen sich Selektivitäten die im Bereich $\alpha=3$ liegen. Diese Selektivität ist erwartet worden, da die Sorptionskonstanten von IgG etwas höhere Werte zeigen als bei reinen elektrostatischen Wechselwirkungen. Bei den Einzelmessungen konnte keine Erhöhung der Selektivität nach dem Waschvorgang beobachtet werden. Das liegt daran, dass durch das statische Verfahren das Protein aus der Waschlösung wieder adsorbiert werden konnte. Die Konzentration der Waschlösung liegt zwischen 25 mg/ml und 50mg/ml und damit auf dem Plateau der IgG-Sorptionsisothermen. Dadurch ist eine erneute Adsorption von Protein wahrscheinlich. Bei den Einzelmessungen besteht zusätzlich keine Konkurrenz um die Bindungsplätze. Daher

werden sowohl IgG als auch HSA mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Waschlösung wieder Adsorbiert. Somit können alle möglichen Bindungsplätze mit einer Proteinart besetzt bleiben. Das ändert sich jedoch bei der Mischungsmessung. Dabei sind für die Adsorption zwar ähnliche Selektivitäten wie bei den Einzelmessungen gefunden worden, die Selektivitäten nach dem Waschvorgang sind aber deutlich erhöht worden. Dabei spielt die Affinität der Polymere eine große Rolle, da auch hierbei die Proteine in einer statischen Methode getestet worden sind. Das heißt, während es Waschvorgangs können gelöste Proteine wieder adsorbiert werden. In diesem Fall gibt es aber eine Konkurrenz zwischen IgG und HSA. Durch diese Konkurrenz werden die Proteine bevorzugt adsorbiert, die eine höhere Affinität zum Polymer haben. Das ist im vorliegenden Fall das IgG und dementsprechend wird adsorbiertes HSA ausgewaschen und die Selektivität erhöht.

Die Dode Monomere stabilisieren die Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen. Mit diesen Wechselwirkungen bindet Dode an den hydrophoben Aminosäuren wie Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin. Da diese Aminosäuren hauptsächlich in einer hydrophoben Tasche in IgG zu finden ist (Abb. 6.2 grün markierte Aminosäuren), ist die Stabilisierung der Proteinbindung weniger stark als beim β -Cyc.

Bei diesen Membranen zeigt sich auch ein Einfluss des Basismaterials. Hierbei sind die Proteine auf Cellulose Membranen besser stabilisiert worden, was zu höheren Desorptionswerten führt. Dieser Effekt ist auf mögliche Wechselwirkungen der hydrophoben Monomereinheiten mit der Membranoberfläche zurückzuführen. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen der hydrophoben Teile des Polymers mit der recht hydrophoben PET-Oberfläche. Durch diese Umorientierung stehen weniger mögliche Bindungsstellen zur Verfügung und die Bindung zum Protein wird geschwächt. Durch diese Schwächere Bindung kann nun mehr Protein von der Oberfläche gewaschen. Auf den Cellulose Membranen erfolgt diese Orientierung nicht, wodurch sich mehr Polymerbausteine an der Stabilisierung der Protein-Polymer Bindung beteiligen und diese somit besser gewährleistet bleibt.

Auch ist für die Polymere mit Bis/Dode keine Selektivität gefunden worden. Daher ist davon auszugehen, dass die Dode-Monomereinheiten auch die Bindung mit dem HSA unterstützen. Auf der Oberfläche von HSA finden sich auch mehr hydrophobe Aminosäuren (Abb.6.3).^[162] Daher werden diese Monomere bevorzugt mit dem HSA und die Bis Monomere bevorzugt mit den IgG Wechselwirkungen eingehen. Aus diesem Grund werden für dieses Polymer zwar hohe Kapazitäten aber keine Selektivität gefunden.

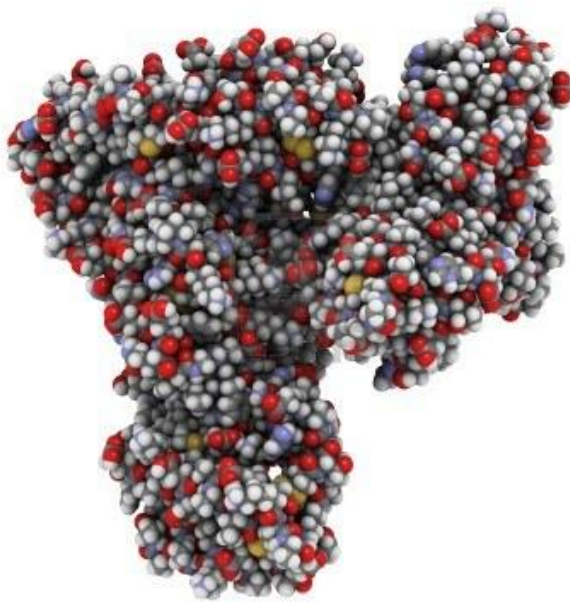


Abbildung 6.3 Schematische Darstellung einer HSA Oberfläche.^[158] Kohlenstoff ist schwarz, Wasserstoff ist weiß, Stickstoff ist blau, Sauerstoff ist Rot und Schwefel ist gelb dargestellt.

Auch die Membranen mit 2-Hydr/NTA zeigen hohe IgG Kapazitäten. Das liegt vor allem daran, dass NTA bevorzugt mit Histidin, Argenin und Lysin wechselwirkt und diese Aminosäuren sind in großer Zahl auf der IgG-Oberfläche enthalten (Abb. 6.2).^[160]

Diese Membranen weisen aber entgegen der Erwartung und trotz hoher IgG-Kapazität keine Selektivität auf. Das ist darauf zurückzuführen, dass auch auf der HSA-Oberfläche Histidin, Argenin und Lysin enthalten ist (Abb 6.3). Die Bindung vom NTA zu diesen Aminosäuren ist sehr stark, wodurch sowohl IgG als auch HSA von NTA adsorbiert wird.^[162]

„Beste Adsorber“

Diese „besten Adsorber“ bestehen aus den Monomeren 2-Hydr und GAMA als „Abstandhalter“, dem geladenen Bis und NTA bzw. β -Cyc als stabilisierendes Monomer. Die Wechselwirkungen sind hierbei für das Bis elektrostatische Wechselwirkungen mit Histidin, Arginin und Lysin. Zusätzlich kommt es noch zu einer hydrophoben Stabilisierung der Bindung durch Wechselwirkungen mit dem Benzolring im Bis und dem Ring des Histidins. Die Stabilisierung durch das β -Cyc erfolgt durch Wechselwirkungen mit Arginin, Lysin, Glycin, Asparagin und Glutamin. Diese Wechselwirkungen werden durch eine „aminophile Tasche“ (den β -Cyclodextrin Ring) im β -Cyc hervorgerufen.

Vom Monomer NTA werden die gleichen Aminosäuren bevorzugt wie vom Bis. Dadurch findet die Bindung nur an den geladenen Aminosäuren statt und es können weniger Bindungsstellen ausgenutzt werden. Die Stabilisierung mit NTA fällt dabei nicht ganz so groß

aus wie bei den Mischungen aus Bis und β -Cyc. Es zeigt sich, dass die Adsorptionskapazitäten der „besten Adsorber“ mit NTA zwar größer sind, aber die Bindung der Proteine weniger stark ist. Das wird daran gesehen, dass 20-30% der Proteine während des Waschvorgangs verloren gehen. Bei den „besten Adsorbern“ mit β -Cyc sind hingegen nur maximal 10% IgG verloren gegangen, was für eine bessere Stabilisierung der Proteine durch das β -Cyc spricht. Gleichzeitig zeigte sich aber auch eine geringere Adsorptionskapazität. Diese geringere Kapazität kann mit dem sterischen Einfluss der sehr großen β -Cyc Monomere erklärt werden. Diese Monomere schränken dabei die Beweglichkeit der Polymere ein, wodurch eine Polymerkette mit weniger Protein Wechselwirken kann.

Wie zu erwarten war zeigen die acht „besten Adsorber“ eine IgG Selektivität sowohl bei den qualitativen Screening Tests als auch bei den quantitativen Messungen. Diese Ergebnisse sind erwartet worden, da die Sorptionskonstanten dieser Membranen hohe IgG Affinitäten zeigen. Außerdem sind die „besten Adsorber“ aus dem Polymer 2-Hydr/Bis/ β -Cyc weiterentwickelt worden welches ebenfalls eine IgG-Selektivität aufweist. Daher ist davon ausgegangen worden, dass die Wechselwirkungen zu den anderen Proteinen nicht so ausgeprägt sind.

Für die „besten Adsorber“ zeigen sich ebenfalls Selektivitäten für die Einzelmessungen die im Bereich $\alpha=3$ liegen. Bei den Einzelmessungen konnte keine Erhöhung der Selektivität nach dem Waschvorgang beobachtet werden. Das liegt wieder daran, dass durch das statische Verfahren das Protein aus der Waschlösung wieder adsorbiert werden konnte. Da es bei der Einzelmessung keine Konkurrenz zwischen den Proteinen um die Bindungsplätze gibt, werden alle möglichen Bindungsplätze mit einer Proteinart besetzt bleiben.

Für die Mischungsmessungen zeigen sich jedoch starke Erhöhungen der Selektivität nach dem Waschvorgang. Vor dem Waschvorgang sind die Selektivitäten der beiden Verfahren vergleichbar. Ebenso wie bei den Membranen mit 2-Hydr/Bis/ β -Cyc ist die Sorptionskonstante zum IgG sehr hoch. Bei Betrachten der Sorptionskonstanten nach dem Waschvorgang fällt auf, dass diese Membranen hohe Konstanten aufweisen. Das heißt, dass diese Membranen starke mit IgG eingehen die deutlich über normale elektrostatische Wechselwirkungen hinaus gehen. Dadurch wird die Bindung zum IgG im Vergleich zum HSA bevorzugt. Das heißt, dass das IgG zum einen stärker an das Polymer gebunden als das HSA und die Affinität der Membranen zum IgG ist größer. Werden nun IgG und HSA von der Membran gewaschen wird bei den geringen resultierenden Konzentrationen bevorzugt IgG resorbiert. Da IgG zusätzlich noch fester an das Polymer gebunden ist als HSA ist ein Auswaschen dieses Protein auch noch unwahrscheinlicher. Diese beiden Phänomene sind dafür verantwortlich, dass die Selektivität bei den Mischungsmessungen nach dem Waschvorgang deutlich erhöht wird.

Bei den dynamischen Messungen haben die „besten Adsorber“ wieder die höchsten IgG-Selektivitäten. Die Membranselektivitäten zeigen dabei auch wieder höhere Ergebnisse bei den Mischungsmessungen als bei den Einzelmessungen. Auch diese Ergebnisse sprechen wieder für Wechselwirkungen die deutlich über elektrostatische Wechselwirkungen hinausgehen.^[115,123]

Auch bei den Messungen mit Lysozym als zweites Protein sind für die „besten Adsorber“ wieder IgG Selektivitäten gefunden worden. Die Selektivitäten sind dabei aber deutlich geringer als die Selektivität gegenüber HSA. Das liegt vor allem daran, dass Lysozym und IgG die gleiche Oberflächenladung aufweisen. Zudem ist Lysozym noch deutlich kleiner als IgG was eine deutlich höhere theoretische Kapazität der Membranen für Lysozym bedeutet. Die IgG-Selektivitäten der „besten Adsorber“ können jedoch mit einem größeren Anteil an Histidin auf der IgG Oberfläche erklärt werden.^[160,163] Dadurch können die Bis Monomere mit mehr Aminosäure auf dem IgG als auf den Lysozym wechselwirken, wodurch eine stärkere Bindung zustande kommt. Auch ist, durch mehr mögliche Bindungsstellen am IgG, die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein Protein überhaupt an der Oberfläche bindet. Zusätzlich dazu ist auch die Größe der Proteine zu berücksichtigen. Am größeren IgG können mehr Polymerketten binden als an einem vergleichsweise kleinen Lysozym. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein eingefangenes Protein auch auf der Oberfläche fixiert bleibt und sich nicht wieder löst. Zusätzlich spielte die Kettenlänge der Pfropf-Polymere eine Rolle. Diese wurden wie für die Ionenaustauscher berechnet (Abschnitt 6.3.1 Referenzmaterialien). Für die „besten Adsorber“ zeigen sich mit durchschnittlich 35 kg/mol recht gering Molmassen, wodurch weder IgG noch das kleinere Lysozym tief genug eindringen können, um eine weitere kinetische Stabilisierung zu erfahren.

Schlechte Adsorber

Im Gegensatz zu den guten Adsorbentien sind für die schlechten Adsorber gleiche, oder geringere Kapazitäten wie für die Basismembran ermittelt worden. Damit zeigen diese Membranen nur wenige attraktive Wechselwirkungen zum IgG und die adsorbierten Proteine werden nicht gegen das Auswaschen stabilisiert. Daher ist mit diesen Membranen nach den Screening Tests nicht weiter gearbeitet worden.

Generell zeigen einige Membranen dabei so geringe Kapazitäten, dass sie schon die Oberfläche vor der Adsorption von IgG in gewisser Weise schützen. Das heißt, dass deutlich weniger IgG an der Membranoberfläche gebunden werden kann als an der Basismembran.^[62] Diese geringen Kapazitäten zeigen alle Mischungen mit Bzamidin und B(OH₂). Der Grund dafür sind die Eigenschaften des Bzamidin und des B(OH₂). Diese zeigen auf Grund ihrer Struktur bevorzugt Bindungen zu Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin. Diese Aminosäuren sind aber in der IgG Kette nur vereinzelt vorhanden.^[160] Daher

sind nur wenige Bindungsstellen für diese Monomere vorhanden und es kann keine spezifische Adsorption stattfinden. Dadurch zeigen diese Membranen auch eine HSA-Selektivität. Die bevorzugten Aminosäuren dieser Monomere, Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin sind in der HSA Oberfläche häufiger vorhanden als im IgG.^[160,162] Daher ist für diese Membranen auch eine HSA-, als eine IgG-Selektivität erwartet worden.

Die Polymere mit den Monomer Ammo verhalten sich ähnlich wie die mit Bzamidin und B(OH₂). Das Monomer Ammo wechselwirkt bevorzugt mit den negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure. Diese Aminosäuren sind aber auch wieder nur vereinzelt auf der IgG Oberfläche vorhanden.^[160] Zusätzlich dazu kommt es noch zu abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ammo und Lysin bzw. Histidin. Diese kommen aber recht häufig auf der IgG Oberfläche vor, wodurch keine großen Kapazitäten von Monomer Ammo zu erwarten waren.^[160]

Generell sind für diese Modifizierungen jeweils keine Selektivitäten oder sogar HSA Selektivitäten gefunden worden. Dabei zeigen sich hierbei Abhängigkeiten von den eingesetzten Monomeren. Wenn nur das Ammo-Monomer und ein Abstandhalter gepfropft werden wie eine HSA-Selektivität gefunden. Diese Selektivität basiert auf den Wechselwirkungen die Ammo eingeht und da auf der HSA Oberfläche mehr Glutaminsäure und Asparaginsäure zu finden ist, ist eine HSA-Selektivität für diese Monomer nicht überraschend. Bei den Mischungen mit anderen Monomeren werden keine Selektivitäten mehr gefunden. Das basiert auf den unterschiedlichen Wechselwirkungen dieser Monomere mit IgG und HSA. In diesen Fällen wird dann eine IgG Adsorption durch das eine Monomer und eine HSA-Adsorption durch das Ammo bevorzugt. Dadurch ist am Ende keine Selektivität für diese Polymere zu finden.

Die hydrophoben Monomere C-Hex und Dode zeigen ebenfalls keine Erhöhung der Kapazität. Diese Polymere gehen dabei bevorzugt Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren wie Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin ein. Diese Aminosäuren sind zwar auf der IgG Oberfläche zu finden allerdings bilden sie eine hydrophobe Tasche. In dieser Tasche ist dann die Konzentration dieser Aminosäuren recht hoch während sie auf der rechtlichen Proteinoberfläche vergleichsweise gering ist.^[160] Dadurch kommt es nur in dieser hydrophoben Tasche zu einer starken Bindung zwischen Protein und Polymer (Abb. 6.2). Allerdings ist der Platz in der Tasche begrenzt wodurch nur ein Teil der Polymerketten Wechselwirkungen eingehen können. Dadurch ist die Stabilisierung der Proteine auf diesen Oberflächen nicht sehr groß was zu geringen Kapazitäten und Selektivitäten führt.

Analyse der Daten: Kapazität pro DG

Beim Vergleich der Kapazitäten mit dem DG-Wert zeigen sich keine generellen Tendenzen. Die Kapazität ist dabei generell stark abhängig vom eingesetzten Monomer und nicht vom erreichten DG-Wert. So zeigen die Membranen mit 2-Hydr zwar hohe DG-Werte, aber nur geringe Kapazitäten, während die Membranen mit 2-Hydr/Dode oder mit 2-Hydr/AMPS bei gleichem DG-Wert eine deutlich größere Kapazität aufweisen. Gegenteilig präsentieren sich die „besten Adsorber“. Diese haben durchschnittlich sehr geringe DG-Werte, aber hohe Adsorptionskapazitäten. Hierbei haben die Membranen mit NTA etwas höhere DG-Werte und gleichzeitig größere Kapazitäten. So zeigt die Erhöhung der Kapazitäten, dass sich die Kapazität nicht ändert, auch wenn der DG-Wert um den Faktor drei erhöht wird. Die höhere Kapazität ist dabei wieder auf das NTA Monomer zurückzuführen. Ebenso zeigen die „besten Adsorber“ mit β -Cyc geringfügig unterschiedliche DG-Werte. Diese Unterschiede haben aber wieder keinen Einfluss auf die Kapazität der Membranen.

Tabelle 6.4 Auftragung der Kapazitäten im Bezug auf den DG-Wert.

Polymer	Kapazität [mg/ml Membran]	DG [μ g/cm ²]	Kapazität/DG [mg Protein/ mg Polymer]
3 Bis / 1 β -Cyc / 1 2-Hydr	2,05	0,14	0,74
3 Bis / 1 β -Cyc / 6 2-Hydr	2,91	0,17	0,87
3 Bis / 1 β -Cyc / 1 GAMA	2,51	0,21	0,58
3 Bis / 1 β -Cyc / 6 GAMA	2,51	0,14	0,90
3 Bis / 1 NTA / 1 2-Hydr	3,73	0,24	0,78
3 Bis / 1 NTA / 6 2-Hydr	3,60	0,15	1,21
3 Bis / 1 NTA / 1 GAMA	3,94	0,16	1,22
3 Bis / 1 NTA / 6 GAMA	4,45	0,27	0,82
2-Hydr / Bis	2,16	0,24	0,44
2-Hydr / β -Cyc	1,77	2,18	0,04
2-Hydr / Dode	1,50	0,64	0,12

Bei der Ppropfdichte verhält es sich anders als beim generellen DG-Wert. Es zeigt sich, dass bei höherer Ppropfdichte auch etwas mehr Protein an der Membran binden kann. Das liegt daran, dass bei höherer Ppropfdichte die Polymerketten in einer recht engen Bürsten-Struktur vorliegen. Durch den geringen Abstand der Polymerketten werden diese weiter aufgerichtet. Dadurch können die Proteine leichter mögliche Bindungsstellen erreichen und es werden keine Bindungsstellen mehr durch das Polymer selbst abgeschirmt. Allerdings kann es aber auch zu Größenausschlusseffekten kommen falls die Polymerketten zu dicht in der Bürstenstruktur stehen können diese den Zugang für große Moleküle erschweren. Dann kann es passieren, dass die Kapazität sogar sinkt. Bei einem höheren DG-Wert hingegen werden nur die Polymerketten länger. Damit gibt es pro Polymerkette mehr Bindungsstellen. Diese Bindungsstellen können dann abhängig von der Polymerlänge mehr Protein binden

oder nur bewirken, dass das Protein fester gebunden wird. Welcher Mechanismus zutrifft ist dabei abhängig von der Länge der Polymerkette und von ihrer Zugänglichkeit. Sofern die Länge und die Zugänglichkeit ausreicht, dass zwei Proteine an der Polymerkette binden können wird die Kapazität erhöht, ist aber eines dieser Kriterien nicht erfüllt wird das Längere Polymer mit noch freien Bindungsstellen am bereits adsorbierte Protein wechselwirken und die Proteinbindung verstärken.^[161]

Beim Betrachten der Kapazitäten in Abhängigkeit von der Polymerzusammensetzung zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den „besten Adsorbern“. Eine noch größere Differenz zeigt sich beim Vergleich mit 2-Hydr/Dode. Hierbei zeigen die „besten Adsorber“ mit β -Cyc als zweitem Monomer für alle getesteten Membranen einen Anteil von ca. 11 mol% an Funktionaleinheiten wie β -Cyc und Bis (Tab. 5.5). Das bedeutet, dass an der Bindung mit dem IgG nur 11 mol% der Monomereinheiten beteiligt sind.

Bei den Messungen zeigen die „besten Adsorber“ mit 2-Hydr/Bis/NTA einen Funktionalgruppenanteil von 17-18 mol% während die „besten Adsorber“ mit GAMA/Bis/NTA einen etwas geringeren Anteil von 11-12 mol% haben, wobei bei diesen „besten Adsorbern“ das Abstandhalter-Monomer einen Einfluss auf die Polymerzusammensetzung hat. Dieser Einfluss konnten bei den „besten Adsorbern“ mit β -Cyc nicht festgestellt werden. Die resultierenden Kapazitäten pro Funktionalgruppenanteil sind in Abbildung 6.4 aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass die Membranen mit 2-Hydr/ β -Cyc und die „besten Adsorber“ mit β -Cyc Verhältnis von eins zu eins aufweisen. Das heißt, dass ein Mol der Funktionalgruppen genau ein Mol Protein Adsorbieren kann. Das gleiche Verhalten zeigen auch die „besten Adsorber“ mit NTA und 2-Hydr als Abstandhalter. Für die Membranen mit 2-Hydr/Bis und dem „besten Adsorber“ mit NTA und GAMA als Abstandhalter zeigt sich sogar eine zwei Molare Kapazität. Also ein Mol der Funktionalgruppen können zwei Mol Protein Adsorbieren. Der Vergleich mit dem Polymer 2-Hydr/Dode zeigt eine deutlich geringere Kapazität pro Funktionalgruppen Anteil von nur ca. 0,2 mol Protein / mol Funktionalgruppen. Beim Betrachten der Polymerzusammensetzung zeigt sich, dass der Funktionalgruppenanteil bei 50% liegt. Daraus lässt sich schließen, dass ein Großteil der Funktionalgruppen gar nicht an der Adsorption beteiligt ist. Das lässt sich wieder mit der hydrophoben Tasche im IgG erklären (Abb. 6.2). Diese ist vergleichsweise klein und bietet nur wenigen Funktionalgruppen Platz für die Bindung.

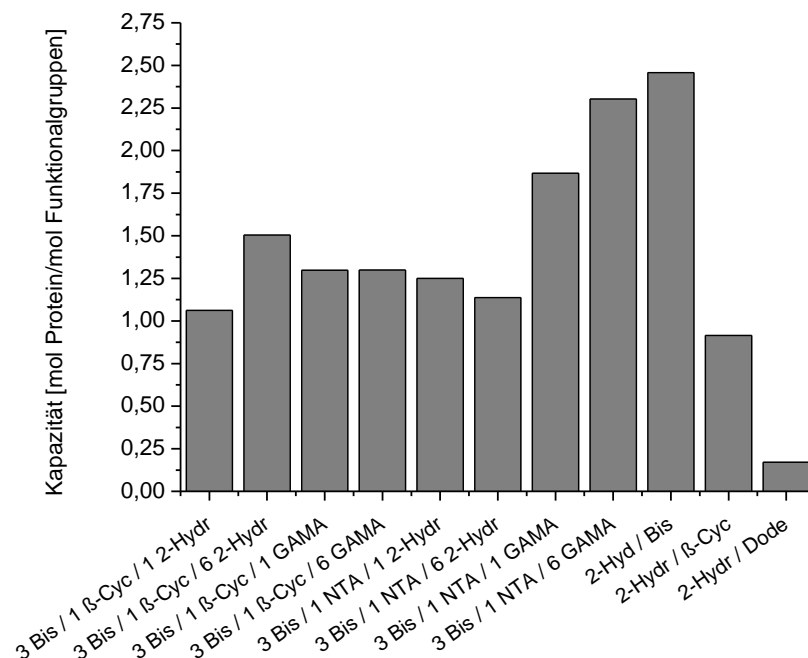


Abbildung 6.4 Kapazitäten der Membranen pro Funktionalgruppenanteil.

Dieser Vergleich zeigt auch, dass ein Funktionalgruppenanteil von 100% keine Erhöhung der Kapazität zur Folge haben dürfte. Das wird beim Vergleich der „besten Adsorber“ mit 2-Hydr/Dode klar. Das 2-Hydr/Dode zeigt, dass nicht alle Funktionalgruppen an der Proteinbindung mitwirken müssen. Die Membranen mit 2-Hydr/Bis und dem „besten Adsorber“ mit NTA und GAMA als Abstandhalter zeigen auch, dass die Anzahl an Bindungsplätzen auf dem IgG begrenzt ist, da diese Membranen eine Kapazität von zwei mol Protein pro mol Funktionalgruppen zeigen. Dieses Verhalten erklärt auch, warum der DG-Wert keinen Einfluss auf die Kapazität hat, wenn das IgG nur bis zu einer gewissen Tiefe in das Polymer eindringen kann. Es werden dann zwar alle Bindungsstellen an einem IgG besetzt, aber selbst wenn noch Bindungsstellen am Polymer vorhanden sind, können diese nicht von einem weiteren IgG erreicht werden.

Adsorptionsisothermen, Mechanismen synergistischer Bindung

Die Isothermen sind von ausgewählten Membranen angefertigt und die Ergebnisse in Abschnitt 5.4.3 aufgetragen worden. Alle Isothermen zeigen dabei einen Langmuirverlauf und daher erfolgt die Ermittlung der Sorptionskoeffizienten (K_{Ad} , K_{De}) und der maximalen Kapazität (q_{max}) mittels Langmuirplot.

Die Ergebnisse der Ionenaustauscher Membranen für K_{Ad} decken sich damit gut mit den in der Literatur^[138] gefundenen Werten für geladene Polymere. Allerdings sind bei diesen Monomeren die K_{De} -Werte zum Teil größer gewesen als die Werte in der Literatur. Es kann

also davon ausgegangen werden, dass durch die Waschschrirte ein Teil des IgGs ausgewaschen worden ist. Dadurch sind wieder freie Polymerketten erhalten worden. Diese Ketten können nun mit dem bereits gebundenen IgG wechselwirken. Diese Wechselwirkung erfolgt an freien Bindungsstellen am IgG. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der Bindung.

Diese Annahme bestätigt auch ein Blick auf die q_{\max} Werte. Bei den Ionenaustauschern VP und VS sinkt dieser wohingegen der K_{De} ansteigt. Daraus resultiert, dass die Kapazität dieser Membranen geringer wird, aber die Bindungsstärke gleichzeitig zunimmt. Bei AMPS hingegen blieben die q_{\max} Werte gleich und der K_{Ad} ist größer als der K_{De} . Das heißt, dass hierbei die Bindungsstärke durch den Waschvorgang geschwächt wird. Das ist dadurch bedingt, dass Protein ausgewaschen wird, aber alle möglichen zugänglichen Bindungsstellen am Protein schon besetzt sind. Dadurch wird nicht mehr die maximale Anzahl an Protein gebunden, es gibt noch freie Polymerketten und die Sorptionskonstante sinkt.

Diese Referenzmessungen zeigen auch, dass Sorptionskoeffizienten K_{Ad} bis 100 ml/mg und K_{De} bis 270 ml/mg auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Höhere Konstanten sind daher auf synergetische Effekte zurückzuführen.

Sorptionskonstanten, die auf elektrostatische Wechselwirkungen hinweisen, sind mit den Monomermischungen 1 Bis/3 2-Hydr, 1 Bis/1 β -Cyc /3 2-Hydr, 3 Bis/1 NTA/1 2-Hydr und 1 Bis/1 Dode /3 2-Hydr erreicht worden. Hierbei zeigen sich auch dieselben Zusammenhänge zwischen den Sorptionskoeffizienten und q_{\max} . Die Sorptionskonstanten zeigen mehr Wechselwirkungen zwischen Protein und Polymer, wenn etwas Protein durch den Waschvorgang verloren geht. Auch hierbei können dann wieder die freigewordenen Polymerketten mit bereits gebundenem Protein wechselwirken und den K_{De} verstärken.

Bei den Mischungen aus 1NTA/3 2-Hydr, 1Dode/3 2-Hydr und 1 Bis/1 Dode/3 2-Hydr zeigen sich recht geringe K_{Ad} aber sehr große K_{De} Werte. Das heißt, dass nach dem Waschvorgang zwar deutlich weniger IgG gebunden ist, dafür aber mehr Polymerketten mit einem IgG wechselwirken. Dafür sprechen auch die q_{\max} Werte, welche nach dem Waschen deutlich kleiner sind. Für die Mischungen mit Dode lässt sich dieser Trend mit der hydrophoben Tasche im Fc Fragment des IgG erklären (Abb. 6.2). An dieser Stelle ist die Anzahl der hydrophoben Aminosäuren im IgG recht groß und das Dode Monomer wechselwirkt bevorzugt an dieser Stelle.^[15,16,17] Diese Wechselwirkungen führen wiederum zu recht stabilen hydrophoben Komplexen und diese sorgen so für eine stärkere Bindung zwischen IgG und Polymer.

Allerdings handelt es sich hierbei nur um einen sehr kleinen Abschnitt des Proteins. Daher kann nur ein Teil der Dode Monomereinheiten diese Tasche erreichen. Verringert sich allerdings die Menge des Proteins auf der Membranoberfläche, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass mehr Dode Monomereinheiten in eine dieser Taschen gelangen und die

Bindung stärken. Das liegt daran, dass die Polymerketten nun mehr Freiheitsgrade haben und somit beweglicher sind.

Für die Beschichtung aus NTA / 2-Hydr kann auch wieder davon ausgegangen werden, dass durch weniger Protein auf der Membran mehr Polymerketten an ein IgG binden und somit die Bindung verstärken. Der große Effekt ist hierbei durch das NTA bedingt, welches stabile Komplexe mit den basischen Aminosäuren bildet.^[116]

Bei den „besten Adsorbern“ mit β -Cyc und 1 β -Cyc/3 2-Hydr sind sehr hohe Sorptionskonstanten gefunden worden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die verwendeten Monomere spezifische Wechselwirkungen mit Aminosäuren eingehen.^[49,113] Von der Struktur her bildet das Bis Monomer bevorzugt mit Histidin einen Komplex, während das β -Cyc eine „aminophile Tasche“ hat und damit bevorzugt mit Arginin, Lysin, Glycin, Asparagin und Glutamin wechselwirkt. Diese spezifischen Wechselwirkungen führen dann zu vergleichsweise stabilen Komplexen.

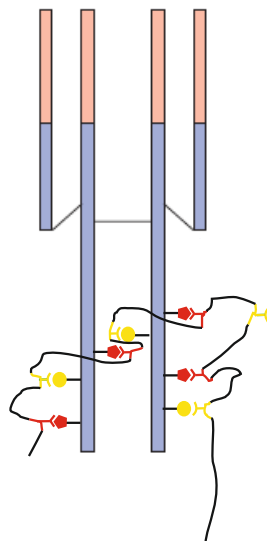


Abbildung 6.5 Schematische Darstellung der Proteinbindung durch ein Funktionalpolymer^[12]

Bei der Betrachtung der Copolymere fällt dazu noch auf, dass zwischen den „aktiven“ Monomeren Bis und β -Cyc recht viele „Abstandhalter“-Monomere 2-Hydr bzw. GAMA vorhanden sind (Tab. 5.5). Dadurch ist nicht nur die Wahrscheinlichkeit gering, dass Bis und β -Cyc im Polymer selbst miteinander wechselwirken, sondern es gibt auch viele Freiheitsgrade für die „aktiven“ Monomere. Mit einem Anteil von 11%, ist der Anteil an Funktionalgruppen im Polymer recht gering und durch die alternierende Anordnung der Monomereinheiten ist der Anteil an „Abstandhalter“-Monomeren zwischen den Funktionalgruppen recht groß. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit auch recht groß, dass diese Monomereinheiten ihre bevorzugten Aminosäuren erreichen (Abb. 6.5). Aufgrund der recht starken nicht kovalenten Bindung zwischen den Aminosäuren und den

Funktionalgruppen kommt es dann zu diesen große Sorptionskonstanten. Diese Sorptionskonstanten sind dabei deutlich größer als die für einfache elektrostatische Wechselwirkungen (Tab. 5.8). Daher kann bei diesen Polymeren von einer „synergistischen“ Wechselwirkung mit dem Protein gesprochen werden.

Auch bei diesen Membranen kommt es aber zu einem Auswaschen von Protein, allerdings nicht zu mehr Wechselwirkungen mit den Polymerketten. Dadurch sind die K_{De} Werte kleiner als die K_{Ad} Werte und wie beim AMPS zeigt sich auch keine große Änderung in den q_{max} Werten.

Tendenziell zeigen die „besten Adsorber“ mit NTA ein gleiches Verhalten wie die Mischungen mit β -Cyc. Allerdings sind hierbei die synergistischen Effekte nicht so stark ausgeprägt. Das liegt vor allem daran, dass NTA im Vergleich zu β -Cyc nur mit den basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin stabile Komplexe bildet.^[116] Desweiteren ergibt sich dann eine Konkurrenz zwischen Bis und NTA um diese Aminosäuren. Dadurch wird der Einfluss des Bis auf die Adsorption verringert. Beim Betrachten des Funktionalgruppenanteils und der Anordnung der Monomere fällt auf, dass die „besten Adsorber“ mit NTA einen ähnlich geringen Anteil an Funktionalgruppen wie die „besten Adsorber“ mit β -Cyc und auch wieder einer alternierende Anordnung aufweisen. Dadurch ist es diesen Polymer auf wieder möglich mit den bevorzugten Aminosäuren zu wechselwirken. Durch diese bevorzugten Wechselwirkungen zeigen sich wieder Sorptionskonstanten die deutlich größer sind als wenn nur elektrostatische Wechselwirkungen an der Bindung beteiligt sind.

Bei den Sorptionskonstanten sind die K_{De} Werte kleiner als die K_{Ad} Werte und das zeigt an, dass keine Erhöhung der Wechselwirkungen durch ein Auswaschen von Protein stattfindet. Bei den q_{max} Werten ist festzustellen, dass die $q_{max De}$ größer sind als die $q_{max Ad}$, was wiederum nicht für ein Auswaschen von geringen Mengen Protein spricht. Vielmehr spricht es für eine Veränderung der Bindung zwischen Protein und Polymer. Hierbei werden dann Bindungsstellen frei die Vorher nicht verfügbar waren und es kommt zu einer höheren Kapazität. Dadurch beteiligen sich weniger Polymerketten an der Bindung und die K_{De} -Werte verringern sich.

6.3.2 Vergleich statische-, dynamische Adsorption

Beim Vergleich der statischen mit der dynamischen Adsorption (Abschnitt 5.4.4) fällt auf, dass die Ergebnisse annähernd gleich sind. Für die Basismembran und die „besten Adsorber“ mit β -Cyc sind gleiche Ergebnisse für beide Adsorptionsmethoden gefunden worden. Erwartet worden ist allerdings eine gewisse Abnahme der Kapazität aufgrund der kurzen Adsorptionszeit von 4 min. Es ist vermutet worden, dass diese Zeit nicht für eine vollständige Sättigung der Membranen ausreicht. Diese Zeit ist aber gewählt worden, um mit einer vergleichsweise hohen IgG Konzentration zu arbeiten. Die Konzentration des IgGs an den Membranen ist dabei annähernd gleich der Konzentration bei den statischen Messungen.

Für die „besten Adsorbern“ mit NTA und bei den Ionenaustauscher-Membranen zeigt sich auch, dass die Kontaktzeit nicht für eine vollständige Sättigung ausgereicht hat. Hierbei sind die Kapazitäten etwa um den Faktor zwei kleiner als bei den statischen Adsorptionsmessungen. Diese Abnahme ist zum einen durch die kurze Adsorptionszeit und zum anderen durch die Sorptionskonstanten bedingt. Die kurze Adsorptionszeit hat zur Folge, dass die Adsorption sehr schnell durchgeführt werden muss.

Aufgrund der höheren Sorptionskonstante ist es nur für die „besten Adsorbern“ mit β -Cyc möglich, in der kurzen Zeit die volle Menge an Protein zu adsorbieren. Da mit der größeren Sorptionskonstante auch eine größere Affinität einhergeht, können diese Membranen das Protein schnell und auch bei geringerer Konzentration effektiv adsorbieren.^[161]

Nach dem Waschvorgang zeigen alle Membranen eine etwas geringere Kapazität bei der dynamischen Adsorptionsmethode als bei der statischen. Die Werte sind dabei 10-20% geringer. Diese Abnahme ist durch den Waschvorgang zu erklären. Dabei fließen mehr als 10 Säulenvolumen durch die Membranen. Der Unterschied der Waschvorgänge bewirkt, dass bei der statischen Methode wieder ein Teil des ausgewaschenen Proteins durch die Membranen eingefangen werden kann. Dies ist besonders bei den „besten Adsorbern“ der Fall, da sie eine hohe Affinität aufweisen. Bei der dynamischen Methode ist aber die Waschlösung konstant ausgetauscht worden und somit können abgelöste Proteine nicht mehr resorbiert werden. Dadurch kommt es zu der gemessenen Differenz.

In Abbildung 6.6 sind die Ergebnisse der Einzel- und der Mischungsmessungen für die dynamische Methode noch einmal verglichen worden. Dabei zeigt sich, dass die Tendenzen für die beiden Messmethoden gleich sind. Die Basismembranen und die konventionellen Ionenaustauscher zeigen bei beiden Methoden nur eine geringe IgG Selektivität. Wohingegen die „besten Adsorber“ deutlich größere Selektivitäten aufweisen. Der Unterschied zwischen den Messungen zeigt sich auch bei diesen Membranen am deutlichsten. Die Einzelmessungen ergeben Selektivitäten von 2 – 2,5. Im Gegensatz dazu erhöhen sich die Selektivitäten bei den Mischungsmessungen deutlich um den Faktor zwei.

Die Abweichungen der Basismembran und der konventionellen Ionenaustauscher liegen hingegen im Bereich des Fehlers der Messungen, also bei ca. 20%.

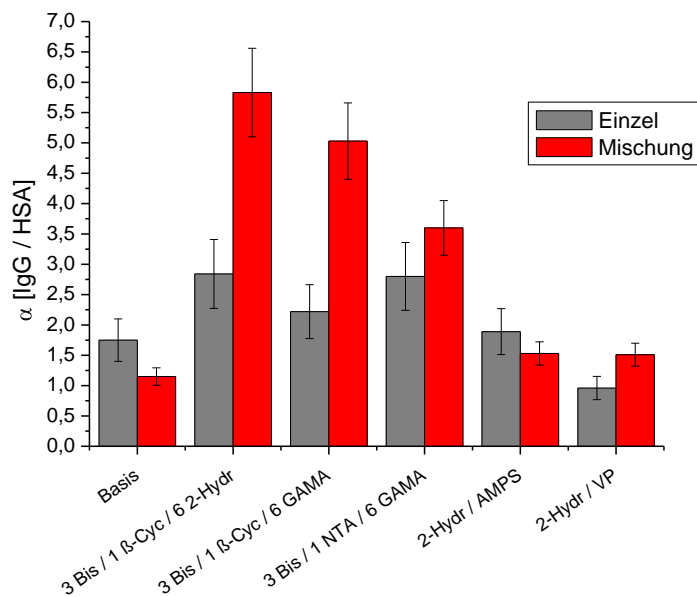


Abbildung 6.6 Vergleich der dynamischen Selektivitätsmessungen nach der Desorption. Einzel entspricht den Ergebnissen der Einzelmessungen und Mischung den Ergebnissen der dynamischen Mischungsmessungen, die mittels GPC Charakterisiert worden sind.

6.3.3 Erhöhung der Kapazität, Titerplatten-Prozedur

Wie bei der Erhöhung des DG-Werts, sind die Erhöhung der Kapazität mit denselben Membranen getestet worden (Abschnitt 5.6, 5.6.1). Dabei zeigte sich, dass keine Änderung der Kapazität durch die Variation des DG-Werts herbeigeführt werden kann. Die ermittelten Kapazitäten liegen alle im Bereich der Ausgangskapazität von 2,5 mg/ml Membran. Es zeigt sich also, dass die Erhöhung des DG-Werts um den Faktor zwei nicht ausreichend ist. Die Kettenlänge ist auch bei diesen Polymeren noch nicht lang genug um mehr Protein zu adsorbieren.

Für die „Kamm ähnlichen“-Strukturen zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Kapazität der Membranen ist dabei unabhängig von der gepfropften Menge an „bestem Adsorber“. Es zeigt sich auch, dass die „Rückgrat“-Polymere einen deutlichen Einfluss auf die Adsorptionskapazität haben. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den „Rückgrat“-Polymeren mit HEMA / DMAPAA. Mit diesem „Rückgrat“-Polymer ist zwar der höchste DG-Wert für den „besten Adsorber“ gefunden worden, aber auch die geringsten Kapazitäten. Was damit zu begründen ist, dass die negativ geladenen Bis Monomereinheiten mit dem positiv geladenen DMAPAA wechselwirken und diese Wechselwirkungen in Konkurrenz mit dem Histidin auf der IgG Oberfläche steht. Durch diese Konkurrenz wird der Anteil an

bindenden Bis Monomeren deutlich verringert. Weiterhin kommt es auch zu einer starken Knäuelbildung der Polymerketten. Dadurch werden die kurzen Ketten des „besten Adsorbers“ abgeschirmt und können nicht mehr mit dem Protein wechselwirken.^[144] Aufgrund der Struktur und der Ladung ist vom „Rückgrat“-Polymer keine große Adsorptionsfähigkeit mehr zu erwarten.

Für das „Rückgrat“-Polymer 2-Hydr zeigt die Tendenz, dass die Adsorptionskapazität bei größerer Pfropfdichte verringert worden ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Diffusion der Proteine zwischen die Polymerketten mit zunehmender Dichte eingeschränkt wird.^[159] Durch diese etwas eingeschränkte Diffusion kann weniger IgG die „besten Adsorber“ zwischen den 2-Hydr Ketten erreichen und die Adsorptionskapazität wird verringert.

Eine klare Tendenz wie beim 2-Hydr kann bei „Rückgrat“-Polymer HEMA nicht gesehen werden. Es zeigt sich zwar, dass die Adsorptionskapazität für das „Rückgrat“-Polymer mit 30 min UV-Zeit geringer ist als für das mit 10 min, aber innerhalb einer UV-Zeit ist keine klare Abhängigkeit von der Pfropfdichte zu erkennen. Bei 30 min UV-Zeit bedeutet das, dass die Kapazitäten für alle Photoinitiator Anteile etwa gleich groß sind. Das liegt daran, dass die Pfropfdichte dieses „Rückgrat“-Polymer generell sehr groß ist und damit zu einer geringen Diffusion bei allen Pfropfdichten führt. Dadurch ist es für das IgG schwer, die Ketten des „besten Adsorbers“ zu erreichen. Dann findet die Adsorption nur auf der Oberfläche und nicht zwischen den Polymerketten statt. Allerdings sind auf der Oberfläche nur geringe Mengen an „besten Adsorbern“ zu finden.

Beim „Rückgrat“-Polymer HEMA mit 10 min UV-Zeit und den Photoinitiatoranteilen von 10% und 50%, ist die Pfropfdichte hingegen sehr gering und die Menge an „bestem Adsorber“ vergleichsweise groß. Daher werden diese Proben so angesehen dass der „beste Adsorber“ nicht zwischen den HEMA Ketten zu finden ist, sondern auf der Membranoberfläche wie bei der Basismembran.^[89] Auch die ermittelten Adsorptionskapazitäten sprechen für diese Annahme. Für den Photoinitiatoranteil von 80% ist der DG-Wert vergleichbar mit dem von 2-Hydr bei demselben Photoinitiatoranteil und auch die Kapazitäten liegen im selben Bereich. Also ist der „beste Adsorber“ hierbei zwischen den HEMA Ketten zu finden. Dadurch muss das Protein wieder zwischen die Polymerketten diffundieren und die Adsorptionskapazität ist verringert worden.

Ein weiterer Grund für die verringerte Kapazität bei den „Kamm ähnlichen“-Strukturen ist, dass nicht alle „besten Adsorber“-Ketten erreicht werden. Wenn ein Protein zwischen die Ketten der „Rückgrat“-Polymere diffundiert, wird es von den ersten Ketten des „besten Adsorbers“ abgefangen. Dadurch wird der Zugang zu den darunterliegenden „besten Adsorbern“ blockiert und die theoretische Kapazität kann nicht erreicht werden.

Beim herunterskalieren der Membrangröße durch die Titerplatten-Prozedur zeigen sich annähernd gleiche Adsorptionskapazitäten bei den 5 mm und 47 mm Membranen. Die Abweichung zwischen den 47 mm Membranen und den 5 mm Membranen beträgt nicht mehr als den Messfehler. Daher können die Ergebnisse als gleich angesehen werden und es gibt somit keine Unterschiede im Verhalten der zwei Membrandruchmesser.

6.4 Molekular geprägten Polymere

Die molekular geprägten Polymere wurden auf die Cellulose Membranen gepfropft um einen Vergleich zu den maßgeschneiderten Polymeren zu haben. Dabei war von Interesse, wie sich die MIPs im Bezug auf die Pfropf-Polymerisation, die Adsorptionskapazitäten und im Bezug auf die IgG Selektivitäten verhalten.

6.4.1 Präparation

Die MIPs sind auf zwei verschiedene Arten hergestellt worden. Um den Einfluss des IgGs bzw. des T10 während der Reaktion sichtbar zu machen, sind NIPs hergestellt worden. Die Ergebnisse dieser Pfropfungen sind in Abschnitt 5.7.1 aufgetragen. Diese Daten zeigen, dass die NIPs und MIPs, welche mit IgG hergestellt worden sind, sich bei der Pfropf-polymerisation gleich verhalten. Dabei weisen sie die gleichen DG-Werte wie das „Abstandhalter“-Monomer 2-Hydr auf. Auch ist wieder eine klare Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte zu erkennen gewesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es keine negative Beeinflussung der Reaktion durch die Zugaben von IgG gibt. Auch ist durch den Vergleich mit dem Monomer 2-Hydr klar, dass sich die Monomere nicht negativ beeinflussen. Dies ist bei der Reaktion auch nicht zu erwarten gewesen. Die Monomere Methacrylamid und Methacrylsäure tragen jeweils eine funktionelle Gruppe, die anziehende Wechselwirkungen zur anderen eingehen kann. Auch die Struktur des Vernetzers lässt nicht darauf schließen, dass es zu abstoßende Wechselwirkungen oder einen großen sterischen Einfluss kommt. Es zeigt sich auch, dass das IgG die Reaktion nicht negativ beeinflusst. Dafür verantwortlich ist zum einen die recht geringe Konzentration von 2 mg/ml Reaktionslösung, als auch eine mögliche Koordinierung der Monomere um das IgG. Diese Koordinierung ist möglich gewesen, da sowohl partiell positive und partiell negative geladene Monomere vorhanden sind. Durch diese Koordinierung haben die Monomere nicht zu viel Abstand voneinander gehabt und konnten miteinander reagieren.

Bei der Änderung der Templates vom IgG zu Peptid T10 sind die DG-Werte geringfügig größer geworden und die Abhängigkeit von der Photoinitiatordichte ist verschwunden. Daher ist davon auszugehen, dass die Polymerisation durch das T10 beeinflusst worden ist. Aufgrund seines Aufbaus (Abb. 4.6) ist es möglich, dass das Peptid T10 attraktive Wechselwirkung sowohl mit Methacrylsäure als auch mit Methacrylamid eingehen kann.

Dabei ist eine Koordinierung der Methacrylsäure an die Lysine im T10 wahrscheinlich und die Methacrylamide können mit den Glycinen Wechselwirkungen eingehen. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass das T10 recht schnell nach Beginn der Pfropf-Polymerisation an der Oberfläche adsorbiert worden ist. Durch diese Adsorption konnten die beiden Monomere gleichzeitig mit der Oberfläche wechselwirken und es kommt zu einer Anreicherung an Monomer an der Membranoberfläche. Aufgrund der höheren Monomerkonzentration an der Oberfläche ist die Reaktion verbessert worden. Diese Verbesserung ist aber begrenzt, da die Koordinierung der Monomere um das T10 auch in der Lösung stattfindet. Dadurch ist Menge an verfügbarem T10 auf der Oberfläche reduziert worden und die Polymerisation nur bis zu einem gewissen Grad erhöht worden.

Der Grad der Erhöhung fällt bei 50% Photoinitiatoranteil größer aus als bei 80%. Dieser Unterschied ist auf den Abstand zwischen den Polymerketten zurückzuführen. Bei einem Photoinitiatoranteil von 80% stehen die Polymerketten dichter beieinander als bei 50%. Dadurch ist es bei der hohen Photoinitiatordichte für die Agglomerate aus T10 und Monomer schwieriger zwischen die Polymerketten zu gelangen. Wenn die Agglomerate zwischen die Polymerketten gelangen können, ist die Verweilzeit dieser Agglomerate auf der Oberfläche der Membranen vergrößert worden. Bei dieser längeren Verweilzeit ist dann auch die Wahrscheinlichkeit größer, dass es zu einer Polymerisation kommt und die Agglomerate ins Polymer eingebaut werden.

6.4.2 Kapazität und Selektivität in Vergleich zum DG

Die IgG-Kapazitäten und Selektivitäten sind im Abschnitt 5.7.2 und 5.7. dargestellt. Beim Vergleich der MIPs mit den NIPs fällt auf, dass beide ähnliche Kapazitäten aufweisen. Es gibt auch nur bei den NIP, die bei einer kurzen UV-Zeit von 10 min hergestellt worden sind, eine Tendenz im Bezug auf die Pfropfdichte. Bei diesen Membranen nimmt die Kapazität mit zunehmender Pfropfdichte deutlich ab. Dieser Trend zeigt, dass die Adsorption zwischen den Polymerketten stattfindet und es ist für das Protein mit zunehmender Dichte schwieriger, zwischen die Ketten zu diffundieren. Die Abwesenheit dieses Trends bei längeren UV-Zeiten zeigt eine höhere Vernetzung der Polymere an. Durch diese höhere Vernetzung wandelt sich die Polymerstruktur von einer Kettenstruktur in eine Netzstruktur um. Diese Netzstruktur hat dann eine ähnliche „Maschenweite“ für die MIPs und die NIPs. Aufgrund der eingesetzten Monomere ergeben sich dann für die MIPs und für die NIPs ähnliche Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen beeinflussen dann die Kapazität der Membranen am stärksten, wodurch ähnliche Ergebnisse für die NIPs und MIPs gefunden worden sind.

Beim Wechsel vom IgG zum HSA zeigen sich dann aber, besonders bei den hohen Pfropfdichten, deutlichere Unterschiede zwischen NIPs und MIPs. Generell ist die maximale Kapazität für HSA mit 1,8 mg/ml Membran zwar deutlich geringer als die maximale Kapazität

für IgG. Aber diese maximale HSA Kapazität zeigt ein NIP, welches die annähernd gleiche Kapazität für IgG aufweist. Besonders bei den MIPs mit dem Epitop Peptid T10 zeigt sich der gewünschte „Schlüssel Schloss“-Charakter. Für diese Membranen sind nur sehr geringe HSA Kapazitäten gefunden worden. Diese Kapazitätsänderung beruhte dabei lediglich auf einer Koordinierung und Fixierung der Säure- und Amid-Gruppen um das Templat. Durch diese Koordinierung und Fixierung können sich Polymere nicht mehr neu ausrichten und somit weniger attraktive Wechselwirkungen mit dem HSA eingehen. Dabei zeigt sich auch, dass die MIPs mit IgG eine kleinere Änderung zeigen als die MIPs mit T10. Dieser Effekt ist dadurch bedingt, dass die Konzentration der Reaktionslösung mit 2 mg/ml IgG bzw. T10 gleich gewesen ist. Aufgrund der deutlich höheren Molmasse vom IgG sind dadurch deutlich weniger Moleküle in der Lösung gewesen und es konnten weniger Kavitäten gebildet werden. Zusätzlich dazu hat das T10 den Vorteil, dass es nur einen Teil des Proteins abbildet. Dadurch sind die gebildeten Kavitäten kleiner, wodurch die Wahrscheinlichkeit verringert wird, dass ein HSA in einer dieser Kavitäten Wechselwirken kann. In den größeren Kavitäten vom IgG ist es möglich, dass ein HSA hinein diffundierte und genügend Möglichkeiten für attraktive Wechselwirkungen vorfindet. Daraus ergeben sich dann deutlich Unterschiede zwischen Adsorption und Desorption und dementsprechend auch Unterschiede für die Selektivitäten. Nach der Adsorption sind dabei für die NIPs und MIPs mit IgG ähnliche Selektivitäten gefunden worden. Das beruht darauf, dass bei diesen Membranen die Bindungsstellen annähernd gleich sind, da die durch IgG gebildeten Kavitäten groß genug sind, dass HSA darin wechselwirken kann. Bei der verwendeten Einzelmessmethode gibt es dann auch keine Konkurrenz zwischen IgG und HSA, wodurch sich die Oberflächen der NIPs und MIPs mit IgG ähnlich gut für die Adsorption der Proteine eignen. Ein klarer Unterschied ist jedoch bei den Membranen mit T10 gefunden worden. Durch die kleineren Kavitäten des T10 ist die Erhöhung der Adsorptionsselektivität um den Faktor zwei erreicht worden.

Auch nach der Desorption sind die Selektivitäten der MIPs mit T10 größer als die MIPs mit IgG bei hohen Pflöpdichten und deutlich größer als die der NIPs. Die NIPs zeigen nach der Desorption nur noch eine geringe bis keine IgG-Selektivität mehr. Aufgrund der statistischen Co-Polymerisation auf diesen Membranen ist zu erwarten gewesen, dass die Säure- und Amid-Gruppen gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt sind und es für die Adsorption von IgG genauso viele Möglichkeiten gibt wie für das HSA. Die etwas größere Adsorption des IgGs im Vergleich zum HSA deutete aber darauf hin, dass das IgG fester an der Oberfläche gebunden werden konnte als das HSA. Das liegt an der Größe des IgGs, wodurch mehr Gruppen für Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Bei den MIPs zeigen sich nach der Desorption etwas größere Selektivitäten als bei den NIPs. Das zeigt, dass HSA zwar in den IgG-Kavitäten binden konnte, aber die Wechselwirkungen nur schwach sind. Das HSA

konnte deshalb leichter wieder ausgewaschen werden. Da dieser Effekt besonders bei der hohen Pfropfdichte stark ausgeprägt ist, heißt das, dass bei der hohen Pfropfdichte die meisten IgG Kavitäten gebildet werden. Anders sieht es bei den MIPs mit T10 aus. Die höchste Selektivität ist bei einem Photoinitiatoranteil von 50% gefunden worden. Daraus lässt sich schließen, dass bei der mittleren Dichte mehr Kavitäten für das IgG zugänglich sind. Da bei dieser Photoinitiatordichte auch der größte DG-Wert erreicht worden ist, sind bei der Dichte auch mehr Kavitäten zu finden als bei 80%. Daher zeigt sich ein guter Zusammenhang zwischen DG-Wert und Selektivität bei diesen Membranen. Zusätzlich ist die geringe Größe dieser Kavitäten für die hohe Selektivität verantwortlich. Dabei sind diese Kavitäten für HSA nicht zugänglich und es wird die spezifische Oberfläche für die HSA Adsorption deutlich verringert. Da allerdings auch HSA außerhalb der Kavitäten binden konnte, ist die Selektivitäten auch hierbei durch das Waschen weiter erhöht worden. Dabei ist die Erhöhung um den Faktor zwei genau so groß wie die Erhöhung für die MIPs mit IgG bei 80% Photoinitiatoranteil.

6.4.3 Vergleich MIP mit den maßgeschneiderten Polymeren

Beim Vergleich der Kapazitäten zeigt sich, dass die MIPs und die maßgeschneiderten Polymere in einem ähnlichen Bereich liegen. Allerdings ist die maximale Kapazität der MIPs nach der Desorption etwas größer als die der maßgeschneiderten Polymere. Diese höhere Kapazität ist dabei auf die um den Faktor zehn höheren DG-Werte der MIPs zurückzuführen. Daher zeigen die MIPs im Vergleich zu den „besten Adsorbern“ deutlich geringere Kapazitäten, wenn auf den DG-Wert normiert wird. Die Kapazität der „besten Adsorber“ beträgt dabei 0,63 mg/mg Polymer während die Kapazität der MIPs lediglich 0,12 mg/mg Polymer beträgt. Beim Vergleich zeigt sich weiter, dass die Selektivitätsergebnisse der Einzelmessungen für die MIPs mit T10 höher sind als für die maßgeschneiderten Polymere. Auch hierbei zeigt sich aber wieder, dass die Selektivität im Bezug auf das gepfropfte Polymer mit einer Selektivität für die maßgeschneiderten Polymere größer ausfällt. Dieser Unterschied liegt dabei vornehmlich an der Struktur. Da die maßgeschneiderten Polymere nicht vernetzt vorliegen, haben diese Polymere mehr Freiheitsgrade und die Bindung zu passenden Stellen auf den IgG kann leichter stattfinden. Auch ist die Selektivität dieser Membranen nicht von der Fixierung von Bindungsstellen abhängig. Durch die Fixierung von vorgegeben Bindungsstellen können zwar auch gute Selektivitäten erreicht werden, aber aufgrund der geringeren Beweglichkeit dieser Polymere wird deutlich mehr Polymer benötigt. Auch ist dabei die Geschwindigkeit der Adsorption durch die Diffusion der Proteine in die Kavitäten beschränkt.

7. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollten PET- und Cellulose-Membranen mit maßgeschneiderten Polymeren modifiziert werden, damit sie Selektiv IgG adsorbieren. Zu diesem Zweck ist eine neue Methode zur UV-Pfropfung entwickelt worden. Bei dieser Methode wird ein „Typ I“ Photoinitiator, der auf Benzoinethylether basiert, kovalent auf der Membranoberfläche immobilisiert. Zu diesem Zweck ist Benzoinethylether erfolgreich in den Photoinitiator 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure umgewandelt worden.

Die Kopplung dieses Photoinitiators konnte erfolgreich auf den PET-Membranen mittels der in Abschnitt 4.2 erklärten Methode 1 durchgeführt werden. Auch konnte dieser Photoinitiator mittels Methode 2 (Abschnitt 4.2) auf Cellulose-Membranen immobilisiert werden. Weiterhin ist die 4-Ethoxy-5-oxo-4,5-diphenylpentansäure bromiert worden. Diese Bromierung ist zwar erfolgreich gewesen, hat aber zu Nebenprodukten geführt. Allerdings konnten sowohl das Produkt als auch das Nebenprodukt auf der Cellulose-Membranoberfläche immobilisiert werden (Abschnitt 4.2, Methode 3). Dieses mehrfach bromierte Nebenprodukt zeigt aber keinen Einfluss auf die Pfropf-Polymerisation. Das ergeben die Vergleichsmessungen mit Membranen, die nach Methode 2 und 3 vorfunktionalisiert worden sind.

Ein Vergleichstest mit der etablierten „Synergist Immobilisierung“ zeigt, dass mit den drei neuen Methoden ähnliche Pfropfdichten erreicht werden. Dazu wird aber deutlich weniger Photoinitiator benötigt und die neuen Methoden zeigen noch eine bessere Kontrolle auf Oberflächen wie Cellulose. Auch konnte der Anteil an Nebenprodukten im Vergleich zur „Synergist Immobilisierung“ deutlich reduziert werden. Daher kann diese neue Methode nach dem Vergleichstest als deutlich überlegen angesehen werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit ist noch gezeigt worden, dass durch die Zugabe von Benzoesäure bzw. Benzoesäurebromid, zum entsprechenden Photoinitiatorderivat, die Dichte an Photoinitiator variiert werden kann. Bei der Variation ist aufgefallen, dass die Benzoesäuregruppen eine Anreicherung an Photoinitiator bewirkten. Im Zuge der Variation der Photoinitiatordichten sind auch die Pfropfdichten untersucht worden. Hierbei zeigt sich eine klare Abhängigkeit der Pfropfdichten von den Photoinitiatordichten. Dazu konnte noch gezeigt werden, dass sich Polymerstruktur von der Pilzstruktur zur Bürstenstruktur umwandelt. Anhand von eigenen experimentellen Daten zu Pfropfdichten und Molmassen des Pfropfpolymeren sowie Referenzdaten aus der Literatur konnte dies im Rahmen eines etablierten Modells auch quantitativ bestätigt werden (Abschnitt 4.2).

Im Anschluss an die Untersuchung der neuen Methode zur UV-Pfropfung sind die Pfropfpolymerisationen mit den maßgeschneiderten Monomeren durchgeführt worden. Im ersten Schritt sind diese Monomere erfolgreich auf die PET-Membranen gepfropft worden. Allerdings zeigt sich, dass die DG-Werte stark vom jeweiligen Monomeren bzw. der jeweiligen Monomermischungen abhängen. So sind Unterschiede im DG-Wert von einem

Faktor zwanzig gefunden worden. Weiterhin haben die Copolymere größere DG-Werte als die Homopolymere gezeigt. Daher sind alle weiteren Pfropf-Polymerisationen als Copolymerisationen mit einem „Abstandhalter“-Monomer durchgeführt worden. Als „Abstandhalter“-Monomer ist das Monomer N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid ausgewählt worden, da es aufgrund seiner Struktur keine hohe Affinität zu Proteinen aufweist. Als optimale Mischung ist eine Mischung von 3 Teilen Abstandhalter zu einem Teil funktionalem Monomer ermittelt worden. Mit diesen Mischungen sind erneut Pfropf-Polymerisationen durchgeführt worden und es zeigt sich, dass der Abstand zwischen den reaktivsten und den unreaktiven Monomeren verringert werden konnte. Allerdings beträgt der Abstand immer noch etwa den Faktor zehn.

Im weiteren Verlauf sind die Pfropf-Copolymerisationen auch auf den Cellulose-Membranen durchgeführt worden. Dabei ist genau wie bei den PET-Membranen eine starke Abhängigkeit des DG-Werts von den eingesetzten Monomeren festgestellt worden. Zwar liegen die DG-Werte für PET- und Cellulose-Membranen im selben Bereich, aber es ist dennoch ein Einfluss des Membranmaterials auf die Pfropf-Polymerisation gefunden worden. Dabei zeigt sich, dass besonders die Monomere, die eine ähnliche chemische Struktur haben, auf der entsprechenden Membran besser polymerisieren. Das heißt, auf den PET-Membranen zeigen die hydrophoben Monomere einen etwas höheren DG-Wert, während auf den Cellulose-Membranen die Monomere höhere DG-Werte aufweisen, welche Wasserstoffbrückenbindungen zu den OH-Gruppen der Cellulose eingehen können. Abhängig von den Monomeren hat es dabei auch die Möglichkeit gegeben, den DG-Wert durch längere Reaktionszeiten oder einer höheren Monomerkonzentration zu beeinflussen.

Für Monomere, die keine Wechselwirkungen untereinander aufweisen, ist die Erhöhung des DG-Werts problemlos möglich und auch die Menge an gepfropftem Polymer ist nur durch die eingesetzte Monomermenge begrenzt. Dagegen zeigen die Monomere, die abstoßende Wechselwirkungen untereinander aufweisen, einen Grenzwert, bis zu dem eine Erhöhung möglich ist. Um diesen Grenzwert zu erhöhen ist in dieser Arbeit weiterhin die Polymerarchitektur auf der Membranoberfläche verändert worden. Dabei ist von der Bürstenstruktur auf eine „Kamm ähnlich“-Struktur gewechselt worden. Dazu ist auf den Cellulose-Membranen erfolgreich ein „Rückgrat“-Polymer gepfropft worden. Auf diesem „Rückgrat“-Polymer ist dann noch einmal Photoinitiator immobilisiert worden und eine Pfropfung mit sich abstoßenden Funktionalmonomeren durchgeführt worden. Diese Pfropfung konnte dabei auch erfolgreich durchgeführt werden und diese Polymerarchitektur etabliert werden. Allerdings ist keine Erhöhung des Grenzwerts erreicht worden. Auch bei dieser Methode ist nur der Grenzwert erreicht worden.

Es zeigt sich also, dass die Pfropf-Polymerisationen auf unterschiedlichen Oberflächen und sogar auf bereits gepfropften Polymeren durchgeführt werden kann. Allerdings konnten für einige Funktionalmonomere nur sehr geringe DG-Werte erreicht werden.

Mit den gepfropften Membranen sind im Anschluss Adsorptionstests durchgeführt worden. Bei diesen Tests wird die Kapazität der Membranen gegenüber IgG geprüft. Diese Tests zeigen, dass die Beschichtung der Membranen einen starken Einfluss auf die IgG Kapazität hat. Dabei spielte es keine Rolle, ob PET- oder Cellulose-Membranen beschichtet worden sind. Die Ergebnisse werden in erster Linie von den Co-Polymeren beeinflusst. Dabei ist nur bei einem Teil der Beschichtungen eine Erhöhung der IgG-Kapazität gefunden worden, einige andere zeigen dagegen sogar eine Verringerung der Kapazität.

Die Membranen mit denen eine gute Kapazität und Affinität für die Bindung von IgG erreicht worden ist, enthielten dieselben funktionalen Monomere, die in parallelen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Schrader als Bausteine für nicht gepfropfte Homopolymere mit besonders hoher Affinität identifiziert worden waren. Diese Arbeit ist von der Frau Latza während ihrer Promotion durchgeführt worden. Mit diesen „besten Adsorbern“ sind zwar keine hohen DG-Werte erreicht worden aber dafür hohe IgG-Kapazitäten.

Weitere Messungen von Adsorptionsisothermen zeigen auch hohe Affinitäten dieser Membranen zum IgG. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung dieser „besten Adsorber“ zu mehr Wechselwirkungen als nur elektrostatischen führt. Im Vergleich zu konventionellen Ionenaustauschern zeigen sich deutlich höhere Affinitäten. Wobei hier von synergistischen Effekten gesprochen werden kann, da die „besten Adsorber“ einen geringen DG-Wert haben und nur einen vergleichsweise geringen Anteil an funktionalen Monomereinheiten aufweisen. Beim Vergleich der dynamischen mit der statischen Kapazität zeigen sich für diese Membranen ähnliche Ergebnisse. Aufgrund der hohen Affinität ist keine lange Kontaktzeit mit der IgG-Lösung für die „besten Adsorber“ nötig, um die volle IgG-Kapazität zu erreichen.

Im Bezug auf die Tests der Selektivitäten zu IgG und HSA zeigt sich, dass die „besten Adsorber“ gute IgG Selektivitäten aufweisen. Dabei sind vor den quantitativen Bestimmungen zuerst Screeningtests mittels Elektrophorese durchgeführt worden. Diese zeigen, dass neben den „besten Adsorbern“ nur wenige Beschichtungen eine IgG Selektivität aufweisen. Darunter sind neben den Ausgangsmischungen für die „besten Adsorber“ auch noch zwei der konventionellen Ionenaustauscher. Diese zeigen bei den statischen Messungen auch noch IgG Selektivitäten im Bereich der „besten Adsorber“. Allerdings sind diese Selektivitäten unter strömenden Bedingungen nicht mehr gefunden worden. Unter diesen Bedingungen konnten nur noch Selektivitäten für die „besten Adsorber“ festgestellt werden. Diese Selektivitäten sind dabei auch noch größer im Vergleich zu den statischen Messungen.

Daher konnte festgestellt werden, dass in dieser Arbeit selektive Membranadsorber hergestellt werden konnten.

Dabei zeigt sich noch zusätzlich, dass diese Membranadsorber unabhängig von ihrer Größe funktionieren. Die Membranen konnten dabei zum Beispiel auf 5 mm Größe gebracht werden und in einer Titerplatte funktionalisiert werden. Diese Art der Funktionalisierung hatte dabei keinen Einfluss auf den DG-Wert der Membranen oder auf die IgG-Kapazität.

Weiterhin sind noch MIPS hergestellt worden. Die Herstellung erfolgte mit der neu entwickelten Initiierungsmethode zur Synthese von gepfropften MIP-Schichten. Es sind dabei zwei Arten von MIPS hergestellt worden. Zum einen die MIPS nach der Ganzprotein-Methode und zum anderen MIPS nach der Epitop-Methode. Das Epitop-Peptid und die Zusammensetzung der Monomerlösung ist durch die Arbeitsgruppe von Dr. Börje Sellergren zur Verfügung gestellt worden (Abschnitt 4.3.3). Mit den so hergestellten MIPS sind Kapazitäten und Selektivitäten erreicht worden, die mit den „besten Adsorbern“ vergleichbar sind. Ein Vergleich der MIPS mit den Funktionalpolymeren zeigt, dass die DG-Werte der MIPS zwar größer sind als die der Membranen, aber es ist sowohl die Kapazität als auch die Selektivität der beiden Membranarten vergleichbar. Daher zeigt sich, dass in dieser Arbeit Antikörper-selektive Membranen auf zwei Arten hergestellt werden konnten.

Für weitere Arbeiten hat sich die Methode des kovalent immobilisierten „Typ I“ als sehr empfehlenswert erwiesen. Diese Methode ist gut kontrollierbar, variabel im Bezug auf die Monomerauswahl und im Bezug auf die Oberflächen, die damit modifiziert werden können. Weiterhin ist eine Skalierung der Membrangröße auf ein für Anwendungen akzeptables Niveau interessant. Als Letztes könnten noch mit der Titerplatten Methode Screeningtests durchgeführt werden um die „besten Adsorber“ in Kapazität und Selektivität noch weiter zu verbessern.

8. Literaturverzeichnis

- [1] M. Ulbricht, *Polymer*, **2006**, 47, 2217-2262.
- [2] D. He, M. Ulbricht, *Macromol. Chem. Phys.*, **2007**, 208, 1582–1591.
- [3] D. He, H. Susanto, M. Ulbricht, *Prog. Polym. Sci.*, **2009**, 34, 62-98.
- [4] N. Labrou, Y.D. Clonis, *J. Biotech.*, 1994, 36, 95-119
- [5] A. Bossi, S.A. Piletsky, E.V. Piletska, P.G. Righetti, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5281-5286
- [6] C. Renner, J. Piehler, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 620-628
- [7] A. Takasu, K. Iso, T. Dohmae, T. Hirabayashi, *Biomacromol.*, **2006**, 7 (2), 411-414
- [8] W. Demmer, D. Nussbaumer, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 852, 73–81.
- [9] T. N. Warner, S. Nochumson, *BioPharm. Int.*, **2003**, 1-3
- [10] A. Fagraeus, *J. Immuno.*, **1948**, 58(1), 1-13
- [11] S. Dübel, P. Rohrbach, A. Schmiedl, *Biol. Unserer Zeit*, **2004**, 34 (6), 372-379
- [12] A. H. Lucas, *Encyclopedia of life sciences*, **2003**, John Wiley & Sons, Ltd.
- [13] H. E. Reis, O. Wetter T. Hake, *J. Mol. Med.*, **1970**, 48, 862-866
- [14] C. Wingren, U. B. Hansson, C. G. M. Magnusson, M. Ohlin, *Mol. Immunol.*, **1995**, 32 (11), 819-827
- [15] C. Wingren, T. E. Michaelsen, C. G. M. Magnusson, U. B. Hansson, *Scand. J. Immunol.*, **1996**, 44, 430-436
- [16] Z. I. Kravchuk, A. A. Chumanevich, A. P. Vlasov, S. P. Martsev, *J. Immuno. Meth.*, **1998**, 217, 131–141
- [17] S. C. Garman, B. A. Wurzburg, S. S. Tarchevskaya, J. P. Kinet, T. S. Jardetzky, *Nature*, **2000**, 406 (6), 259-266
- [18] W. A Marasco, J. Sui, *Nature Biotech.*, **2007**, 25 (12), 1421-1434
- [19] http://www.alderbio.com/5/MARKET_POTENTIAL/ Stand: 20.07.2012
- [20] D. Baron, *Naturwissensch.*, **1990**, 77, 465-471
- [21] C. J. Barnstable, W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williamst A. Ziegler, *Cell*, **1978**, 14 (5), 9-20,
- [22] A. R. Aricescu, W. Lu, E. Y. Jones, *Acta Cryst.*, **2006**, 62, 1243–1250
- [23] F. M. Wurm *Nature Biotech.*, **2004**, 22 (11), 1393-1398
- [24] H. Daniell, S. J. Streatfield, K. Wycoff, *Trends in Plant Sci.*, **2001**, 6 (5), 219-226
- [25] M. D. Smith, *Biotech. Advan.*, **1996**, 14 (3), 267-281
- [26] M. D. McLean, R. Chen, D. Yu, K.Z. Mah, J. Teat, H. Wang, S. Zaplachinski, J. Boothe, J. C. Hall, *Transgenic Res.*, **2012**, 3, 1-11
- [27] Workshop Bibitec, AbCap Meeting, 03.12.2009
- [28] L. Chu, D. K. Robinson, *Current Opinion in Biotech.*, **2001**, 12 (4), 180–187

- [29] B. Kelley , G. Blank , A. Lee, *Process Scale Purification of Antibodies*, 1 Auflage, **2009**, John Wiley & Sons, Inc., 1-24
- [30] Suzanne S. Farid, *BioPharm Int. Supple.*, **2008**, 3
- [31] C. S. Goodyear, G. J. Silverman, *J. Exp. Med.*, **2003**, 197 (9), 1125-1139
- [32] B. J. Compton, M. A. Lewis, F. Whigham, J. S. Gerald, G. E. Countryman, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1314-1317
- [33] P. Cuatrecasas, *J. Biolog. Chem.*, **1970**, 245 (12), 3059-3065
- [34] U. Gottschalk, *Biotechnol. Prog.*, **2008**, 24 (3), 496-503
- [35] G. Jagschies, A. Gronberg, T. Bjorkman, K. M. Lacki, H. J. Johansson, *BioPharm Int.*, **2006**, 6
- [36] J. X. Zhou, T. Tressel, *Biotechnol. Prog.*, **2006**, 22, 341-349
- [37] G. Kern, M. Krishnan, *BioPharm Int.*, **2006**, 19 (10), 32-41
- [38] <http://www.millipore.com/catalogue/module/c7474> Stand: 24.07.2012
- [39] A. L. Zydney, R. Kuriyel, *Methods in Biotechnology Vol. 9, Down Stream Processing of Proteins: Methods and Protocols*, **2000**, Humana Press Inc., New Jersey, 23-32
- [40] H. Yang, C. Viera, J. Fischer, M. R. Etzel, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2002**, 41, 1597-1602
- [41] R. R. Deshmukh, T. N. Warner, F. Hutchison, M. Murphy, W. E. Leitch II, P. De Leon , G. S. Srivatsa , D. L. Cole , Y. S. Sanghvi, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 890, 179–192
- [42] L. R. Castilho, F. B. Anspach, W. D. Deckwer, *J. Mem. Sci.*, **2002**, 207, 253–264
- [43] N. D. Lang, A. R. Williams, *Phys. Rev. B*, **1978**, 18 (2), 616-636
- [44] L. W. Bruch, *Surf. Sci.*, **1983**, 125, 194-217
- [45] D. R. Absolom, W. Zingg, A. W. Neumann, *J. Biomed. Mat. Res.*, **1987**, 21, 161-171
- [46] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2001**, 17, 5605-5620
- [47] G. Ladam, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, J. C. Voegel, *Langmuir*, **2001**, 17, 878-882
- [48] T. Clackson, J. A. Wells, *Science*, **1995**, 267, 383-386
- [49] D. He, W. Sun, T. Schrader, M. Ulbricht, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 253–260
- [50] E. Klein, *J. Mem. Sci.*, **2000**, 179, 1–27
- [51] R. Ghosh, *J Chromatogr A*, **2002**, 952, 13–27
- [52] D.K. Roper, E. N. Lightfoot, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 702, 3–26
- [53] R. Ghosh, T. Wong, *J. Mem. Sci.*, **2006**, 281, 532–540
- [54] Y. S. Polyakov, *J. Mem. Sci.*, **2006**, 280, 610-623
- [55] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, 2. Auflage, **1997**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [56] H. L. Knudsen, R. L. Fahrner, Y. Xu, L. A. Norling, G. S. Blank, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 907, 145–154

- [57] A. W. P. Vermeer, C. E. Giacomelli, W. Norde, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1526, 61-69
- [58] N. Fraud, M. Kuczewski, G. Zarbis-Papastoitsis, M. Hirai, *BioPharm Int. Supplements*, **2009**, 10
- [59] M. Kuczewski, N. Fraud, R. Faber, G. Zarbis-Papastoitsis, *Biotech. Bioeng.*, **2010**, 105 (2), 296-305
- [60] T. Takeuchi, T. Hishiya, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 2459–2467
- [61] H. Nishino, C. S. Huang, K. J. Shea, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2392 –2396
- [62] P. D. Peeva, T. Pieper, M. Ulbricht, *J. Mem. Sci.*, **2010**, 362, 560–568
- [63] H. Guo, M. Ulbricht, *J. Mem. Sci.*, **2010**, 349, 312-320
- [64] A. Rahimpour, S. S. Madaeni, S. Zereshki, Y. Mansourpanah, *Appl. Surf. Sci.*, **2009**, 255, 7455–7461
- [65] I. Pinnau, B. D. Freeman, *Formation and Modification of Polymeric Membranes: Overview*, **2000**, American Chemical Society, 1-22
- [66] S.P. Nunes, B. Ruffmann, E. Rikowski, S. Vetter, K. Richau, *J. Mem. Sci.*, **2002**, 203, 215–225
- [67] H. G. Hicke, I. Lehmann, G. Malsch, M. Ulbricht, M. Becker, *J. Mem. Sci.*, **2002**, 198, 187-196
- [68] N. Adrus, M. Ulbricht, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 3088–3098
- [69] C. Viklund, K. Irgum, *Macromolecules*, **2000**, 33, 2539-2544
- [70] B. A. McCool, N. Hill, J. DiCarlo, W.J. DeSisto, *J. Mem. Sci.*, **2003**, 218, 55-67
- [71] W. Albrecht a,*, J. Schauer b, Th. Weigel a, A. Lendlein, *J. Mem. Sci.*, **2006**, 249, 49-59
- [72] P. Wang, K. L. Tan, E. T. Kang, K. G. Neoh, *J. Mem. Sci.*, **2002**, 195, 103–114
- [73] J. I. Ida, T. Matsuyama, H. Yamamoto, *Biochem Eng. J.*, **2000**, 5 179–184
- [74] S. Minko, *Polymer Surfaces and Interfaces*, 1. Auflage, **2008**, Springer-Verlag, Berlin, 215-234,
- [75] B. Zhao, W.J. Brittain, *Prog. Polym. Sci.*, **2000**, 25, 677–710
- [76] S. Qin, D. Qin, W. T. Ford, J. E. Herrera, D. E. Resasco, *Macromolecules*, **2004**, 37, 9963-9967
- [77] S. Qin, D. Qin, W. T. Ford, D. E. Resasco, J. E. Herrera, *Macromolecules*, **2004**, 37, 752-757
- [78] O. Prucker, C. A. Naumann, J. R  he, W. Knoll, C. W. Frank, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8766-8770
- [79] M. Ulbricht , G. Belfort, *J. Mem. Sci.*, **1996**, 111, 193-215
- [80] P. D. Peeva, N. Million, M. Ulbricht, *J. Mem. Sci.*, **2012**, 390-391, 99-112
- [81] F. Liu, B. K. Zhu, Y. Y. Xu, *Appl. Surf. Sci.*, **2006**, 253, 2096–2101
- [82] A. Friebe, M. Ulbricht, *Langmuir*, **2007**, 23, 10316-10322

- [83] O. Prucker, J. R  he, *Macromolecules*, **1998**, 31, 602-613
- [84] A. H. M. Yusof, M. Ulbricht, *J. Mem. Sci.*, **2008**, 311, 294–305
- [85] M. Ulbricht, A. Oechel, C. Lehmann, G. Tomaschewski, H. G. Hicke, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1995**, 55, 1707-1723
- [86] R. Jordan, A. Ulman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120 (2), 243-247
- [87] R. Jordan, A. Ulman, J. F. Kang, M. H. Rafailovich, J. Sokolov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1016-1022
- [88] J. S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **1995**, 28, 7901-7910
- [89] F. Tomicki, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2011**, 5-7
- [90] D. He, M. Ulbricht, *J. Mem. Sci.*, **2008**, 315, 155–163
- [91] R. S. Davidson, A. A. Dias, D. Illsley, *J. Photochem Photobiol. A: Chem.*, **1995**, 89, 75-87
- [92] M. Aydin, N. Arsu, Y. Yagci, S. Jockusch, N. J. Turro, *Macromolecules*, **2005**, 38, 4133-4138
- [93] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust. J. Chem.*, **2005**, 58, 379-410 Review
- [94] M. H. Stenzel, *Macromol. Rapid Commun.*, **2009**, 30, 1603-1624
- [95] G. Moad, J. Chiefari, Y. K. Chong, J. Krstina, R. T. A. Mayadunne, A. Postma, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polym. Int.*, **2000**, 49, 993-1001
- [96] S. Perrier, P. Takolpuckdee, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, **2005**, 43, 5347–5393
- [97] D. H. Nguyen, *Dissertation*, Georg-August-Universität zu Göttingen, **2007**
- [98] R. Rotzoll, P. Vana, *J. Polym. Sci.*, **2008**, 46, 7656-7666
- [99] D. Roy, J. S. Knapp, J. T. Guthrie, S. Perrier, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 91–99
- [100] M. D. Rowe, B. A. G. Hammer, S. G. Boyes, *Macromolecules*, **2008**, 41, 4147-4157
- [101] M. Benaglia, E. Rizzardo, A. Alberti, M. Guerra, *Macromolecules*, **2005**, 38, 3129-3140
- [102] M. M. Titirici, B. Sellergren, *Chem. Mater.*, **2006**, 18, 1773-1779
- [103] L. Barner, C. Li, X. Hao, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik, T. P. Davis, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, **2004**, 42, 5067–5076
- [104] D. Roy, *Aust. J. Chem.*, **2006**, 59, 229
- [105] P. Sp  gel, L. Schweitz, S. Nilsson, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 372, 37–38
- [106] N. W. Turner, C. W. Jeans, K. R. Brain, C. J. Allender, V. Hladky, D. W. Britt, *Biotechnol. Prog.*, **2006**, 22 (6), 1474–1489
- [107] S. Hjerten, J. L. Liao, K. Nakazato, Y. Wang, G. Zamaratskaia, H. X. Zhang, *Chromatographia*, **1997**, 44 (5/6), 227-234
- [108] A. Rachkov, N. Minoura, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1544, 255-266
- [109] T. Takeuchi, T. Hishiya, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 2459–2467
- [110] A. Nematollahzadeh, S. Wei, C. S. A. Aureliano, D. L  tkemeyer, J. Stute, M. J. Abdekhodaie, A. Shojaei, B. Sellergren, *Angew. Chem.*, **2011**, 123, 515 –518

- [111] M. M. Titirici, B. Sellergren, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378, 1913–1921
- [112] D. S. Janiak, P. Kofinas, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 389, 399–404
- [113] K. Wenck, S. Koch, C. Renner, W. Sun, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 16015–16019
- [114] D. He, W. Sun, T. Schrader, M. Ulbricht, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 253–260
Supplementary data
- [115] W. Sun, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2009**, 126–127
- [116] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules*, **2002**, 35, 6192–6201
- [117]] H. G. Heine, H. Rudolph, *Liebigs Ann. Chem*, **1971**, 754, 28–34
- [118] M. Vavrecka, M. Hesse, *Helv. Chem. Acta*, **1989**, 72, 847–855
- [119] C. Geismann, M. Ulbricht, *Macromol. Chem. Phys.*, **2005**, 206, 268–281.
- [120] A. Mehta, A.L. Zydney, *Proceedings AIChE Conf Ann Meet*, **2006**, 214a.
- [121] S. Ambrosini, M. Serra, S. Shinde, B. Sellergren, E. De Lorenzi, *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 6961– 6969
- [122] D. M. He, M. Ulbricht, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 1860–1868.
- [123] D. He, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2008**
- [124] C. Geismann, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2007**
- [125] K. Matyjaszewski, T. P. Davis, *Handbook of radical polymerization*, 1. Auflage, **2002**
- [126] A. Jena, K. Gupta, *Fluid/Part. Sep. J.*, **2002**, 4, 227
- [127] P. Shao, R. Y. M. Huang, X. Feng, W. Anderson, *AIChE J.*, **2004**, 50, 557
- [128] B. Davis, *Energeia* , **1994**, 5 (6), 1- 5
- [129] D. Dollimore, P. Spooner, A. Turner, *Surf. Tech.*, **1976**, 4, 121–160
- [130] S. Brunauer, L. S. Deming, W. E. Deming, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 62 (7), 1723–1732
- [131] D. L. Carter, M. M. Mortland, W. D. Kemper, *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods*, 2. Auflage, **1986**, US Dep of Agric., Kimberley, 413–423
- [132] H. Kukula ,H. Schlaad ,M. Antonietti,S. Förster, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124,1658–1663
- [133] P. S. Nayak, B.K.Singh, S. Nayak, *J. Enviro. Protec. Sci.*, **2007**, 1, 83 – 91
- [134] H. Rosenfeld, S. Peper, T. Täffner, M. Kötke, M. A. Fonka, H. Temme, B. Niemeyer, *Chem. Ing. Tech.*, **2011**, 83 (8), 1229–1236
- [135] D. H .Williams, I. Fleming, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 2. Auflage, **1971**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [136] R. M. Joshi, S. G. Joshi, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **1971**, 5(8), 1329–1338
- [137] L. J. Young, *J. Polym. Sci.*, **1961**, 54, 411–455
- [138] M. C. Stone, Y. Tao, G. Carta, *J. Chrom. A*, **2009**, 1216, 4465–4474
- [139] V. Neuhoff, R. Stamm, H. Eibl, *Electrophoresis*, **1985**, 6, 427–448

- [140] H. J. Arpe, *Industrielle Organische Chemie*, 6. Auflage, **2007**, John Wiley & Sons Inc, 245
- [141] W. P. Reeves, R. G. Hilbrich, *Tetrahedron*, **1976**, 32 (18), 2235-2237
- [142] G. Ordian, *Principles of Polymerisation*, 4. Auflage, **2004**, John Wiley & Sons Inc
- [143] J. H. Lee, S. C. Kim, *Macromolecules*, **1986**, 19, 644-648
- [144] R. Podgornik, *Croa. Chem. Acta*, **1992**, 65 (2), 285-295
- [145] B. Bae, B. H. Chun, D. Kim, *Polymer*, **2001**, 42, 7879-7885
- [146] A. S. Jönsson, B. Jönsson, *J. Mem. Sci.*, **1991**, 56 (1), 49-76
- [147] P. J. Curran, *Remote Sens. Environ.*, **1989**, 30, 271-278
- [148] W. J. Orts, J. Shey, S. H. Imam, G. M. Glenn, M. E. Guttman, J. F. Revol, *J. Polym. Environ.*, **2005**, 13 (4), 301-306
- [149] J. M. Felix, P. Gatenholm, H.P. Schreiber, *Polym. Comp.*, **1993**, 14 (6), 449-457
- [150] J. Israelachvili, R. Pashley, *Nature*, **1982**, 300, 341-342
- [151] J. P. Fouassier, A. Merlin, *J. Photochem.*, **1980**, 12, 17 – 23
- [152] D. M. Jones, A. A. Brown, W. T. S. Huck, *Langmuir*, **2002**, 18, 1265-1269
- [153] C. Bartholome, E. Beyou, E. Bourgeat-Lami, P. Chaumont, F. Lefebvre, N. Zydowicz, *Macromolecules*, **2005**, 38, 1099-1106
- [154] T. Wu, K. Efimenko, J. Genzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9394-9395
- [155] J. Brandrup, E.H. Immergut, E.A. Grulke, *Polymer Handbook.*, 4. Auflage, **1999** John Wiley & Sons, New York
- [156] R.A. Waggoner, F.D Blum, J.M.D MacElroy, *Macromolecules*, **1993**, 26, 6841-6848.
- [157] N. Grassie, *Pure Appl. Chem.*, **1973**, 34, 247-257
- [158] <http://www.shutterstock.com/gallery-930136p1.html>, Stand 01.02.2013
- [159] H. Yasuda, A. K. Sharma, T. Yasuda, *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.*, **1981**, 19, 1285-1291
- [160] A. Torano, F. W. Putnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 75 (2), 966-969
- [161] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu, D. Li, *Prog. Polym. Sci.*, 2008, 33 1059–1087
- [162] P. C. Sijmons, B. M. M. Dekker, B. Schrammeijer, T. C. Verwoerd, P. J. M. van den Elzen, A. Hoekema, *Nature Biotech.*, **1990**, 8, 217 - 221
- [163] A. R. Thompson, *Biochem. J.*, **1954**, 60, 507-515
- [164] <http://logkow.cisti.nrc.ca/logkow/> Stand: 11.01.2013
- [165] S. Moldoveanu, V. David, *Essentials in Modern HPLC Separations*, **2013**, Elsevier, Amsterdam
- [166] Q. Yang, M. Ulbricht, *Chem. Mater.*, **2012**, 24, 2943-2951
- [167] O. Hollmann, C. Czeslik, *Langmuir*, **2006**, 22, 3300-3305
- [168] J. Klein, K. D. Conrad, *Makromol. Chem.*, **1980**, 181, 227-240
- [169] P. Latza, AbCap Meeting, 23.03.2012

9. Anhang

9.1 Chemikalienliste

Aceton (p.a)	Sigma Aldrich
Acetonitril (HPLC Qualität)	Sigma Aldrich
Acrylamid (99%)	Sigma Aldrich
2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (99%)	Sigma Aldrich
N-(4-Amidinophenyl)methacrylamid	Ak. Schrader
2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol	VWR
Ammoniumperoxodisulfat (98%)	Carl Roth
Argon (>99%)	Linde
α,α' -Azobisisobutyronitril (98%)	Sigma Aldrich
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Benzoessäure (99%)	Sigma Aldrich
Benzoessäurebromid (97%)	Sigma Aldrich
Benzoinethylether (97%)	Sigma Aldrich
Benzophenon (99%)	Sigma Aldrich
N-Benzoyloxycarbonyl-L-lysinmethylester	Sigma Aldrich
Brillant Blau (für Elektrophorese)	Merckmillipore
Brom (Synthese Qualität)	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Carl Roth
N-Bromsuccinimid (99%)	Acros Organics
Chloroform (p.a)	Sigma Aldrich
Celite	Carl Roth
Cellulose-Membranen (RC 60)	Whatman
β -Cyclodextrin (97%)	Sigma Aldrich
N-Cyclohexylmethacrylamid	Ak. Schrader
6'-Deoxy-6'-(N-(2-aminomethyl)methacrylamid- β -cyclodextrin	
Deuteriumoxid	Sigma Aldrich
Dichlormethan	Sigma Aldrich
N,N-Diethylethyldiamin (98%)	Sigma Aldrich
3-Dimethylaminopropylmethacrylat (99%)	Sigma Aldrich
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimide (97%)	Sigma Aldrich
4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin (>99%)	Sigma Aldrich
Dimethylformamid (HPLC Qualität)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (99,5%)	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	VWR
Dodecylmethacrylamid	Ak. Schrader

Epichlorhydrin (99%)	Sigma Aldrich
Epitop-Peptid T10	Ak. Sellergren
Essigsäure (99%)	VWR
Ethanol (p.a)	Sigma Aldrich
Ethylacetat (99%)	Sigma Aldrich
Ethylacrylat (99,5%)	Sigma Aldrich
2-(((Ethylamino)ethyl)methacrylamid)phenylborsäure	Ak. Schrader
Ethylbromacetat (98%)	Sigma Aldrich
Ethylenbisacrylat (99%)	Sigma Aldrich
Ethylendiamin (99%)	Sigma Aldrich
Galwick	Porous Materials Inc.,
D-(Glucoseamidoethyl)methacrylamid	Ak. Ulbricht
Glycerin (Synthese Qualität)	Acros Organics
Glycin (>99%)	Sigma Aldrich
Hexan (p.a)	Sigma Aldrich
Human Serum Albumin (99%)	Sigma Aldrich
2-Hydroxyethylmethacrylat (97%)	Sigma Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	VWR
N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid	Polysciences
Immunglobulin G (>80%)	Sigma Aldrich
Immunglobulin G (>95%)	Sigma Aldrich
Immunglobulin G	Bibitec
Kaliumcarbonat (Wasserfrei)	VWR
Kaliumhydroxid	VWR
Lithiumbromid (>99,9%)	Sigma Aldrich
Lithiumhydroxid (98%)	Sigma Aldrich
Lysozym (>90%)	Sigma Aldrich
2-Methacrylamidoethan-1-ammoniumchlorid	Ak. Schrader
5-(Methacrylamino)-m-xylol-bis-lithiumphosphatdimethylester	
Methacrylamid (99%)	Sigma Aldrich
Methacrylsäure (98%)	Sigma Aldrich
Methacrylsäurechlorid (>97%)	Sigma Aldrich
Methanol (p.a)	Sigma Aldrich
<i>N</i> -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- <i>N</i> -bis(carboxymethyl)- <i>L</i> -Lithiumlysinat	
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Natriumchlorid	VWR
Natriumdihydrogenphosphat	VWR

Natriumdodecylsulfat (>98,5%)	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	VWR
5-Nitro-m-xylol (96%)	Sigma Aldrich
Palladium/Aktivkohle (10% Pd)	Merckmillipore
PET-Kernspurmembranen	Oxyphen
Phosphor (Rot)	Sigma Aldrich
Salzsäure (1M)	Sigma Aldrich
Silica-Gel	Acros Organics
Stickstoff (Gas, >99%)	Linde
Stickstoff (flüssig, >99%)	Linde
Tetrachlormethan (p.a)	Acros Organics
Tetrahydrofuran (HPLC Qualität)	Sigma Aldrich
Tetramethylethylendiamin (Synthese Qualität)	Merckmillipore
para-Toluolsulfonsäurechlorid (99%+)	Acros Organics
Triethylamin (Synthese Qualität)	Merckmillipore
Trifluoressigsäure (99%)	Sigma Aldrich
Trimethylphosphite (97%)	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (99%)	VWR
Ultrafiltratin Membran 1kDa	Satorius-Stedim
Vinylphosphonsäure (97%)	BASF
Vinylsulfonsäure (25%, Natriumsalzlösung)	Sigma Aldrich
Wasserstoff (99,999%)	Linde

9.2 Liste der Publikationen

Veröffentlichungen:

Teile dieser Dissertation wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht.

S. Schwark, M. Ulbricht

Toward protein-selective membrane adsorbers: A novel surface-selective photo-grafting method.

European Polymer Journal, **2012**, 48, 1914-1922

S. Schwark, M. Ulbricht

Toward antibody selective membrane adsorbers: A novel surface-selective photo-grafting method.

Membrane News, **2011**, 85 (11), 21-24

Poster:

07.2011, Amsterdam

S. Schwark, M. Ulbricht

Toward antibody selective membrane adsorbers:
A novel surface-selective photo-grafting method.
ICOM 2011

10.2010, Wetter an der Ruhr S. Schwark, M. Ulbricht

Toward antibody selective membrane adsorbers:
A novel surface-selective photo-grafting method.
“Downstream Days” Summer School

03.2010, Frankfurt am Main S. Schwark, M. Ulbricht

Toward antibody selective membrane adsorbers:
A novel surface-selective photo-grafting method.
DECHEMA Informationstag Membrantechnik

Preise:

07.2011, Amsterdam

Student Award, Poster Presentation, ICOM 2011, von
der *European Membrane Society*, Wert 500€

9.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.